



Validação e controlo de qualidade de métodos para a determinação dos iões nitrato, nitrito e amónio em águas naturais

Maria Eduarda Guimarães Rodrigues

Mestrado em Química

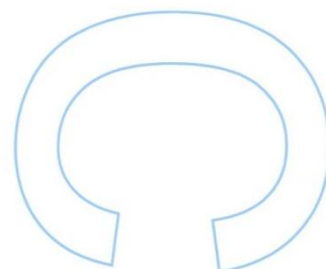
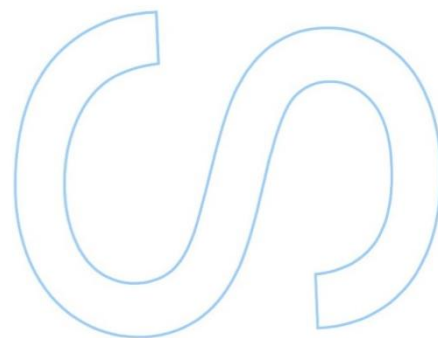
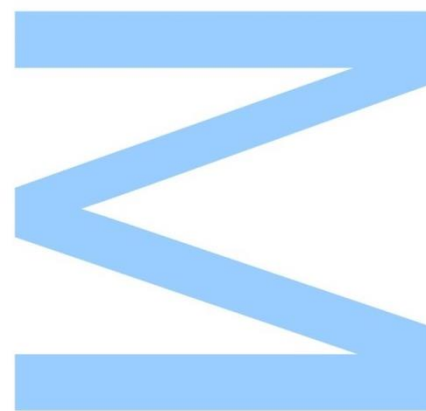
Departamento de Química e Bioquímica
2014

Orientador

Manuel Azenha, Professor Auxiliar, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

Coorientadora

Manuela Silva, Chefe da Divisão de Monitorização e Informação, Agência Portuguesa do Ambiente – ARH Norte

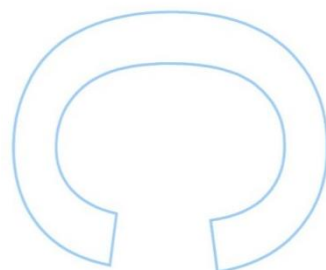
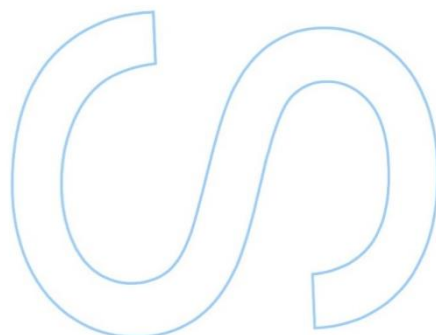
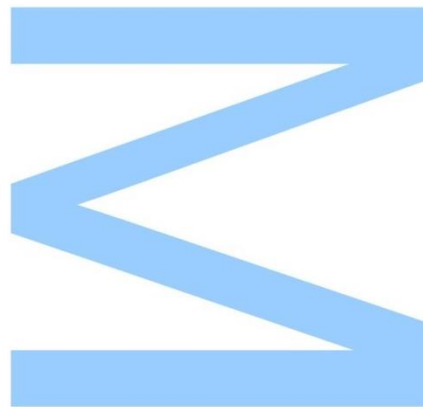




Todas as correções determinadas pelo júri, e só essas, foram efetuadas.

O Presidente do Júri,

Porto, ____/____/____



Agradecimentos

Começo por agradecer à Agência Portuguesa do Ambiente (APA), em particular à Dr^a Manuela Silva e à Dr^a Maria José, pela oportunidade que me deram ao oferecerem este estágio, que considero que foi uma oportunidade única e que me deu confiança para não ter medo de arriscar e não duvidar das minhas capacidades.

Agradeço ao Eng^o Vitorino José pela paciência e o apoio prestado ao longo do estágio, por estar sempre disponível para me ajudar, por tirar qualquer dúvida que fosse surgindo e por me acompanhar na realização da tese. Um muito obrigado pela preocupação que demonstrou e por ter partilhado o seu conhecimento na área.

Relativamente aos funcionários da APA, agradeço a todos os que trabalharam comigo durante o estágio e em especial à Marianela Campos pela amizade e por estar sempre disponível para me ouvir e aconselhar em qualquer assunto, relacionado ou não com o estágio. Agradeço também ao Gaspar Chaves, também pela amizade e por me ter dado a conhecer melhor o seu trabalho.

Agradeço à Helena, pela companhia no laboratório, à Maria Inês por ter estado ao meu lado durante o estágio, a partilhar esta experiência, pois me fez sentir que não estava sozinha. Um muito obrigado a todos os que estiveram ao meu lado durante o estágio.

Um agradecimento aos professores de química da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto (FCUP), em especial aos de química analítica, por terem despertado o meu interesse nesta área.

E, por fim, um especial agradecimento ao meu orientador, professor Manuel Azenha, pela grande ajuda e disponibilidade ao longo deste estágio, agradeço todo o apoio que me deu tanto na elaboração da tese como ao longo do estágio, pelo interesse constante desde o início do estágio, para saber como me estava a adaptar, e no fim para saber o que aprendi com esta experiência.

Resumo

O estágio realizou-se na Administração da Região Hidrográfica do Norte (ARH-Norte), uma delegação regional da Agência Portuguesa do Ambiente, I.P., com responsabilidades na monitorização da qualidade das massas de água da região norte de Portugal. O laboratório de águas da ARH-Norte tem como função analisar amostras de águas naturais e residuais, através de métodos de ensaio que cumpram a legislação em vigor desta matéria. Como parte dessa função, o Laboratório realiza atividade nas seguintes áreas:

- Colheitas de amostras de águas;
- Desenvolvimento e implementação de novas técnicas analíticas;
- Participação em ações de formação (estágios, cursos, etc.);
- Participação em ensaios interlaboratoriais.

O objetivo principal deste trabalho consistiu na validação de três métodos e no seu controlo de qualidade. Os métodos basearam-se na absorção molecular integrada com análise de fluxo contínuo segmentado. Foram validados os métodos de determinação de anião nitrato, anião nitrito e catião amónio em amostras de águas. Na validação destes três métodos foram avaliados os parâmetros: seletividade, linearidade, faixa linear de trabalho, sensibilidade, precisão e exatidão. O controlo de qualidade dos métodos foi feito recorrendo a cartas de Shewart, e de uma maneira geral não se verificaram situações de perda de controlo.

Ao longo do estágio também foram feitas análises de rotina a águas naturais e residuais. Foram analisadas cerca de 30 amostras por semana. As análises realizadas consistiram na determinação de parâmetros físico químicos como o ião cloreto, a carência bioquímica de oxigénio (CBO_5) por dois métodos distintos, oxidabilidade, sólidos suspensos totais, pH, condutividade, alcalinidade e dureza.

Abstract

The internship was realized in Administração da Região Hidrográfica do Norte (ARH-Norte), a regional delegation of Agência Portuguesa do Ambiente, P. I., with the responsibility on the monitorization of water quality of the north region of Portugal. The ARH-Norte's water laboratory has the functions of analyzing natural and residue water's samples, using sample methods that follow the legislation on that matter. As part of this function, the laboratory performs activities on the following areas:

- Water samples collecting;
- Development and implementation of new analytical techniques;
- Participation in training actions (internships, courses, etc.);
- Participation in interlaboratorial analysis.

The main purpose of this work consisted on the validation of methods and their respective quality control. The methods were based on molecular absorption coupled with segmented continuous flow analysis. The methods for determination of nitrate, nitrite and ammonium were validated for natural water samples. The validation included the evaluation of the parameters: selectivity, linearity, linear range, sensibility, precision and accuracy. The quality control was made by using Shewart control charts, and in general the processes were kept under control.

In this internship also routine analysis was made with natural and residual waters. About thirty samples were analysed per week. The analysis consisted on the determination of physical-chemical parameters such as chloride, biochemical oxygen demand (bn_5) by two distinguished methods, oxidability, total suspended solids, pH, conductivity, alkalinity and hardness.

Índice

Agradecimentos	I
Resumo	II
Abstract	III
1. Agência portuguesa do ambiente	1
1.1. ARH-Norte	2
2. Água: um recurso natural	4
2.1. Importância da análise da qualidade de água	5
2.2. Critérios da qualidade de água	6
3. Poluição da água	7
3.1. Azoto	10
3.1.1. Anião Nitrato	11
3.1.2. Anião Nitrito	11
3.1.3. Cátion Amónio	12
4. Legislação sobre a qualidade de água	12
5. Métodos de análise	13
5.1. Fundamentos dos métodos	14
5.1.1. Anião Nitrato	14
5.1.2. Anião Nitrito	15
5.1.3. Cátion Amónio	16
5.2. Espectrofotometria de absorção molecular no UV-visível	18
5.2.1. Componentes do espectrofotómetro	19
5.3. Análise em Fluxo	21
5.3.1. Fluxo contínuo segmentado	22
5.4. Autoanalisador	23
6. Métodos analíticos (e sua validação)	28
6.1. Validação de métodos analíticos	28
6.1.1. Seletividade	29
6.1.2. Linearidade	30
6.1.3. Faixa linear de trabalho/ intervalo de linearidade	31
6.1.4. Sensibilidade	31

6.1.5.	Precisão	32
6.1.5.1.	Repetibilidade.....	32
6.1.5.2.	Precisão intermédia	32
6.1.5.3.	Reprodutibilidade.....	33
6.1.6.	Exatidão	33
6.1.7.	Limite de deteção / Limite de quantificação	34
7.	Controlo de qualidade.....	34
7.1.	Cartas de controlo	35
7.1.1.	Cartas de controlo de médias (Shewart).....	36
7.1.2.	Cartas de controlo cumulativas (CUSUM).....	37
7.1.3.	Cartas de controlo de Zona	39
8.	Objetivos do estágio	40
9.	Procedimentos.....	41
9.1.	Determinação do anião nitrato	42
9.1.1.	Preparação de soluções	42
9.1.2.	Soluções padrão.....	42
9.1.3.	Procedimento experimental	43
9.2.	Determinação do anião nitrito	43
9.2.1.	Preparação de soluções	43
9.2.2.	Soluções padrão.....	43
9.2.3.	Procedimento experimental	44
9.3.	Determinação do catião amónio	45
9.3.1.	Preparação de soluções	45
9.3.2.	Soluções padrão.....	45
9.3.3.	Procedimento experimental	46
10.	Apresentação e discussão dos resultados	47
10.1.	Validação dos métodos.....	47
10.1.1.	Seletividade.....	47
10.1.2.	Linearidade.....	48
10.1.3.	Faixa linear de trabalho/ intervalo de linearidade	53
10.1.4.	Sensibilidade	56
10.1.5.	Precisão	57
10.1.5.1.	Repetibilidade.....	57
10.1.5.2.	Precisão intermédia.....	59
10.1.6.	Exatidão	62

10.1.7. Limite de deteção / Limite de quantificação	64
11. Controlo de qualidade dos métodos validados.....	66
11.1. Determinação da capacidade (desvio padrão) do processo analítico.....	66
11.2. Cartas de controlo	68
12. Conclusões.....	74
13. Bibliografia.....	75
Anexo I	79

Índice de Figuras

Figura 1: Utilização da água por sector em Portugal, adaptado de [10]	5
Figura 2: Poluição da água subterrânea por diferentes origens, adaptado de [15]	9
Figura 3: Ciclo do Azoto, adaptado de [18]	10
Figura 4: Esquema dos componentes principais de um espectrofotómetro	19
Figura 5: Luz a incidir num prisma sendo refratada em diferentes ângulos	20
Figura 6: Cuba tradicional.....	21
Figura 7: Tipos de análise em fluxo	22
Figura 8: Análise em fluxo contínuo segmentado, adaptado de [42]	23
Figura 9: Autoanalisador SKALAR, adaptado de [45].....	24
Figura 10: Gráfico exemplo de uma análise no autoanalisador com a curva de calibração e amostras.....	25
Figura 11: Gráfico exemplo de uma análise no autoanalisador comparando a altura do pico de concentração mais elevada da curva de calibração com amostras de concentração variável.....	25
Figura 12: Gráfico exemplo de uma análise no autoanalisador com amostra muito concentrada, mas sem afetar os resultados obtidos	26
Figura 13: Gráfico exemplo de uma análise no autoanalisador com amostra muito concentrada em que a banda dessa amostra interfere na quantificação de outra amostra.....	27
Figura 14: Avaliação do desempenho com z-scores, adaptado de [48].....	34
Figura 15: Limites de uma carta de controlo, adaptado de [58]	36
Figura 16: Carta de controlo de Shewart, adaptado de [59]	36
Figura 17: Carta de controlo CUSUM, adaptado de [59]	38
Figura 18: Carta de controlo CUSUM com o uso de máscara em V, adaptado de [48].....	38
Figura 19: Carta de controlo CUSUM com o uso de linhas limite, adaptado de [48]....	39
Figura 20: Exemplo de Carta de Controlo de Zona, adaptado de [59].....	40
Figura 21: Esquema de funcionamento do método de determinação de anião nitrato	43
Figura 22: Esquema de funcionamento do método de determinação de anião nitrito..	44
Figura 23: Esquema de funcionamento do método de determinação de catião amónio	46
Figura 24: Ajuste linear do método de determinação de anião nitrato	49
Figura 25: Ajuste não linear do método de determinação de anião nitrato	50
Figura 26: Ajuste linear do método de determinação de anião nitrito	51

Figura 27: Ajuste não linear do método de determinação de anião nitrito	51
Figura 28: Ajuste linear do método de determinação de catião amónio	52
Figura 29: Ajuste não linear do método de determinação de catião amónio	53
Figura 30: Carta de controlo do padrão de 2mgL^{-1} em anião nitrato.....	69
Figura 31: Carta de controlo do padrão de 10mgL^{-1} em anião nitrato.....	69
Figura 32: Carta de controlo do padrão de $10\mu\text{gL}^{-1}$ em anião nitrito.....	70
Figura 33: Carta de controlo do padrão de $30\mu\text{gL}^{-1}$ em anião nitrito.....	71
Figura 34: Carta de controlo do padrão de $30\mu\text{gL}^{-1}$ em catião amónio	71
Figura 35: Carta de controlo do padrão de $100\mu\text{gL}^{-1}$ em catião amónio	72
Figura 36: Carta de controlo de zona do padrão de $10\mu\text{gL}^{-1}$ em anião nitrito	73

Índice de Tabelas

Tabela 1: Dados para a construção da carta de controlo CUSUM	38
Tabela 2: Preparação dos padrões de anião nitrato	42
Tabela 3: Preparação dos padrões de anião nitrito	44
Tabela 4: Preparação dos padrões de catião amónio	46
Tabela 5: Resultados obtidos no estudo da sensibilidade do método de determinação de anião nitrato	47
Tabela 6: Resultados obtidos no estudo da sensibilidade do método de determinação de anião nitrito	48
Tabela 7: Resultados obtidos no estudo da sensibilidade do método de determinação de catião amónio	48
Tabela 8: Resultados obtidos para o estudo de linearidade do método de determinação de anião nitrato	49
Tabela 9: Estudo de linearidade do método de determinação de anião nitrato	50
Tabela 10: Resultados obtidos para o estudo de linearidade do método de determinação de anião nitrito	51
Tabela 11: Estudo de linearidade do método de determinação de anião nitrito.....	52
Tabela 12: Resultados obtidos para o estudo de linearidade do método de determinação de catião amónio	52
Tabela 13: Estudo de linearidade do método de determinação de catião amónio	53
Tabela 14: Resultados obtidos para o cálculo da homogeneidade das variâncias dos padrões de anião nitrato	54
Tabela 15: Cálculo da homogeneidade das variâncias dos padrões de anião nitrato..	54
Tabela 16: Resultados obtidos para o cálculo da homogeneidade das variâncias dos padrões de anião nitrito	55
Tabela 17: Cálculo da homogeneidade das variâncias dos padrões de anião nitrito ...	55
Tabela 18: Resultados obtidos para o cálculo da homogeneidade das variâncias dos padrões de catião amónio.....	55
Tabela 19: Cálculo da homogeneidade das variâncias dos padrões de catião amónio	55
Tabela 20: Resultados obtidos de 10 retas de calibração do anião nitrato	56
Tabela 21: Resultados obtidos de 10 retas de calibração de anião nitrito	56
Tabela 22: Resultados obtidos de 10 retas de calibração de catião amónio	57
Tabela 23: Estudo da repetibilidade do método de determinação de anião nitrato.....	57
Tabela 24: Estudo da repetibilidade do método de determinação de anião nitrito	58
Tabela 25: Estudo da repetibilidade do método de determinação de catião amónio ...	58

Tabela 26: Determinação da precisão intermédia do método de determinação de anião nitrato, usando o padrão de 2mgL^{-1}	59
Tabela 27: Determinação da precisão intermédia do método de determinação de anião nitrato, usando o padrão de 10mgL^{-1}	60
Tabela 28: Determinação da precisão intermédia do método de determinação de anião nitrito, usando o padrão de $10\mu\text{gL}^{-1}$	60
Tabela 29: Determinação da precisão intermédia do método de determinação de anião nitrito, usando o padrão de $30\mu\text{gL}^{-1}$	61
Tabela 30: Determinação da precisão intermédia do método de determinação de catião amónio, usando o padrão de $30\mu\text{gL}^{-1}$	61
Tabela 31: Determinação da precisão intermédia do método de determinação de catião amónio, usando o padrão de $100\mu\text{gL}^{-1}$	62
Tabela 32: Cálculo do z-score dos resultados obtidos para o método de determinação de anião nitrato	63
Tabela 33: Cálculo do z-score dos resultados obtidos para o método de determinação de anião nitrito	63
Tabela 34: Cálculo do z-score dos resultados obtidos para o método de determinação de catião amónio	63
Tabela 35: Valores para o cálculo dos limites de deteção dos métodos.....	64
Tabela 36: Calendário das semanas analisadas	66
Tabela 37: Resultados da análise de duplicados de anião nitrato	67
Tabela 38: Determinação do desvio padrão para as cartas de controlo do método de determinação de anião nitrato.....	67
Tabela 39: Resultados da análise de duplicados de anião nitrito	67
Tabela 40: Determinação do desvio padrão para as cartas de controlo do método de determinação de anião nitrito	68
Tabela 41: Resultados da análise de duplicados de catião amónio	68
Tabela 42: Determinação do desvio padrão para as cartas de controlo do método de determinação de anião nitrato.....	68

1. Agência Portuguesa do Ambiente

A Agência Portuguesa do Ambiente (APA) exerce as funções de Autoridade Nacional da Água e de Autoridade Nacional de Segurança de Barragens. Relativamente à função de Autoridade Nacional de Segurança de Barragens, ela tem as seguintes competências:

- Propor, desenvolver e acompanhar a execução da *política nacional dos recursos hídricos*, de forma a assegurar a sua gestão sustentável, bem como garantir a efetiva aplicação da Lei da Água e demais legislação complementar;
- Assegurar a *proteção*, o *planeamento* e o *ordenamento* dos recursos hídricos;
- Promover o uso eficiente da água e o *ordenamento dos usos* das águas;
- Emitir *títulos de utilização* dos recursos hídricos e *fiscalização* do cumprimento da sua aplicação;
- Aplicar o *regime económico e financeiro* dos recursos hídricos;
- Estabelecer e implementar programas de *monitorização* dos recursos hídricos;
- Gerir *situações de seca e de cheia*, coordenar a adoção de *medidas excecionais em situações extremas* de seca ou de cheias e dirimir os diferendos entre utilizadores relacionados com as obrigações e prioridades decorrentes da Lei da Água e diplomas complementares;
- Promover a *conciliação de eventuais conflitos* que envolvam utilizadores de recursos hídricos, nomeadamente, promovendo o recurso a arbitragens, cooperando na criação de centros de arbitragem e estabelecendo acordos com centros de arbitragem institucionalizados já existentes;
- Promover a elaboração e a execução da *estratégia de gestão integrada da zona costeira* e assegurar a sua aplicação ao nível regional, assegurando a proteção e a valorização das zonas costeiras;
- Prosseguir as demais atribuições referidas na Lei da Água e legislação complementar.

Em relação à função de Autoridade Nacional de Segurança de Barragens, exerce funções no âmbito, nomeadamente, do *controlo de segurança*, bem como da promoção e fiscalização do *cumprimento do Regulamento de Segurança de Barragens* [1]. A Lei n.º 58/2005, de 29 de dezembro (Lei da Água), transpondo para direito nacional a Diretiva n.º 2000/60/CE, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 23 de outubro, e estabelecendo as bases e o quadro institucional para a gestão sustentável

das águas, criou cinco Administrações de Região Hidrográfica (ARH, I. P.) e determinou as respetivas atribuições e competências a nível da gestão das águas e da respetiva circunscrição territorial. Consagrou ainda como princípio a região hidrográfica como unidade principal de planeamento e gestão das águas, tendo por base a bacia hidrográfica como estrutura territorial.

Por outro lado, o Decreto-Lei nº 208/2007 de 29 de maio definiu a missão e atribuições das ARH, I. P. Assim, com a sua entrada em vigor, as ARH, I. P. passam a exercer as competências cometidas às Comissões de Coordenação e Desenvolvimento Regional (CCDR), criadas pelo Decreto-Lei n.º 134/2007, de 27 de abril, em matéria de recursos hídricos, nomeadamente no que se refere ao exercício das competências de fiscalização e licenciamento.

1.1. ARH-Norte

De acordo com o Decreto-Lei n.º 134/2007, de 27 de abril, a ARH do Norte, I. P., é um instituto público periférico integrado na administração indireta do Estado, prossequindo atribuições do Ministério do Ambiente, do Ordenamento do Território e do Desenvolvimento Regional (MAOTDR), tendo como missão proteger e valorizar as componentes ambientais das águas, bem como proceder à gestão sustentável dos recursos hídricos no âmbito da respetiva circunscrição territorial de atuação [2].

Deste modo, e conforme estipulado no artigo 1.º da Portaria n.º 393/2008, de 5 de junho, a Administração de Região Hidrográfica do Norte, I. P. (ARH do Norte, I. P.) sucede à CCDR Norte no domínio dos recursos hídricos em todas as posições jurídicas por ela tituladas.

A portaria n.º 394/2008, de 5 de junho, no desenvolvimento do Decreto-Lei n.º 208/2007, de 29 de maio, aprova os estatutos da Administração da Região Hidrográfica do Norte, I. P., com efeitos a 1 de julho de 2008 e determina a sua estrutura e organização interna. O Laboratório de Águas insere-se no Departamento de Planeamento, Informação e Comunicação, ao qual compete, no que se refere ao Laboratório (alínea o) do ponto 1 do artigo 6.º da Portaria 394/2008:

- Assegurar o funcionamento, operacionalidade e eficácia das estruturas laboratoriais, quando existentes [3].

De acordo com o artigo 3.º da mesma portaria, por decisão do Presidente podem ser criadas, modificadas ou extintas unidades orgânicas de 2.º grau, designadas por divisões ou gabinetes. Assim, no Departamento de Planeamento, Informação e

Comunicação foram contempladas 2 divisões, nomeadamente a Divisão de Planeamento e Comunicação e a Divisão de Monitorização e Informação, sendo nesta última unidade que se insere o Laboratório [3].

O Laboratório de Águas da ARH do Norte, I. P. tem o seu enquadramento legal na ARH do Norte, I. P., e insere-se na Divisão de Monitorização e Informação do Departamento de Planeamento, Informação e Comunicação. O Laboratório da ARH do Norte, I. P., de acordo com as suas competências, executa ensaios em amostras de águas naturais e residuais, com vista a dar cumprimento à legislação em vigor nesta matéria, nomeadamente o Decreto-Lei nº 236/98, de 1 de agosto e a Diretiva Quadro da Água, e ainda a solicitações de outros Departamentos da ARH do Norte, I. P. e de entidades externas, no âmbito das suas competências [4].

Tendo como atividade principal o citado anteriormente, o Laboratório realiza também outras ações que lhe são inerentes, nas seguintes áreas:

- Colheitas de amostras de águas;
- Desenvolvimento e implementação de novas técnicas analíticas;
- Participação em ações de formação (estágios, cursos, etc.);
- Participação em ensaios interlaboratoriais.

Tal como já foi acima referido, o Laboratório da ARH do Norte, I. P. realiza trabalhos e serviços por solicitação de entidades exteriores, no âmbito das suas competências. Os principais clientes são:

- Outros departamentos da ARH do Norte, I. P., no âmbito de ações de licenciamento e fiscalização;
- Organismos do MAOTDR – Ministério do Ambiente, do Ordenamento do Território e do Desenvolvimento Regional;
- Tribunais, procuradoria-geral da República, polícia judiciária e outros organismos estatais.

O Laboratório da ARH do Norte, I. P. executa ensaios em 2 áreas fundamentais:

- Química e físico-química, no setor de ensaios físico-químicos;
- Biologia, que inclui a bacteriologia, no setor de ensaios de microbiologia e biologia.

2. Água: um recurso natural

A água é um recurso essencial à vida, indispensável para a humanidade, mas também para outros organismos e para a manutenção das funções e da integridade dos ecossistemas [5]. A água e o ar são elementos sem os quais não seria possível a vida na Terra como a conhecemos hoje. O corpo humano tem aproximadamente 70% de água e uma ligeira redução deste valor pode conduzir à morte. Na verdade o Homem adulto pode viver entre duas a três semanas sem alimentos, mas apenas três a quatro dias sem água [6].

A água é um elemento fundamental para o desenvolvimento sustentável dos países, pelo que a falta de água ou a falta de água com qualidade diminuem a qualidade de vida das populações. Devido ao aumento da população humana as necessidades de água têm vindo a aumentar; no entanto, as atividades humanas direta ou indiretamente podem diminuir a qualidade da água, tornando-a imprópria para determinados fins, ou seja, podem diminuir a quantidade de água com qualidade para ser utilizada em algumas atividades [7].

Cerca de 70% da superfície terrestre está coberta com água no estado líquido encontrando-se, sobretudo, nos oceanos e apenas uma pequena parte nos continentes e na atmosfera. Cerca de 97,4% da água é salgada e por isso imprópria para consumo e dos 2,6% de água doce, a grande maioria encontra-se no estado sólido nos glaciares e calotes polares do Ártico e Antártico e em águas subterrâneas. Além disto, cerca de 3/4 da água doce encontra-se num estado em que não é possível a sua utilização, pelo menos a curto e médio prazo, em que as águas superficiais constituem uma ínfima parte da água doce, o que demonstra uma necessidade de conservá-la [6, 8].

A água pode ser classificada em dois tipos: águas superficiais e águas subterrâneas, que diferem na origem de captação. As águas superficiais são, por exemplo, os rios, as albufeiras e lagos, e as subterrâneas são, por exemplo, lençóis subterrâneos, fissuras de terrenos e furos [6].

Segundo a Diretiva 2000/60/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, as águas de superfície e subterrâneas são, em princípio, recursos naturais renováveis. Em especial, a garantia do bom estado das águas subterrâneas exige uma ação atempada e um planeamento estável, a longo prazo, das medidas de proteção, dado

que a sua formação e renovação decorrem, naturalmente, ao longo de grandes períodos de tempo. Esses longos períodos de tempo devem ser tomados em consideração na calendarização das medidas destinadas a alcançar um bom estado das águas subterrâneas e a inverter qualquer tendência significativa e sustentada de aumento da concentração de poluentes nas águas subterrâneas [9].

A procura de água no País foi estimada em cerca de 7500 milhões de m³ por ano (últimos dados oficiais obtidos para o Plano Nacional da Água), sendo o setor da agricultura o maior utilizador com um volume total correspondente a cerca de 87% e, conseqüentemente, a atividade que maior pressão exerce sobre os recursos hídricos desse ponto de vista, contra 8% para abastecimento urbano às populações e 5% para a indústria, como ilustrado na figura 1 [10].

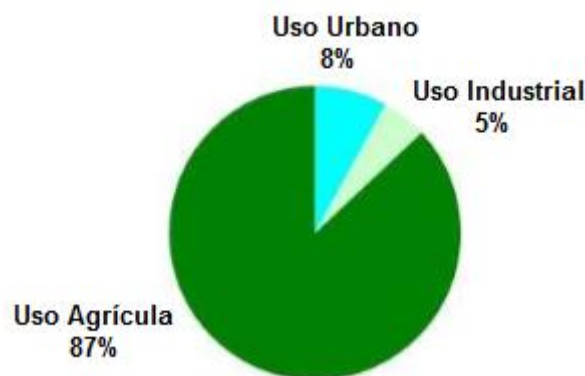


Figura 1: Utilização da água por sector em Portugal, adaptado de [10]

2.1. Importância da análise da qualidade de água

A água é indispensável a todas as formas de vida e desempenha um papel vital para o bom funcionamento dos ecossistemas terrestres. É um património natural precioso e fundamental para a manutenção da vida no Planeta e um bem indispensável para o desenvolvimento das atividades humanas e económicas, que deve ser protegido e salvaguardado. A água é necessária para o fabrico de quase tudo. O papel, a gasolina, o ferro e muitos outros produtos exigem apreciáveis quantidades de água para serem produzidos [8, 10].

O conceito de qualidade da água é relativo, já que depende do uso a que se destina ou do objetivo do seu utilizador. Assim, a qualidade da água pode ser definida, para fins específicos, como o conjunto de características físicas, químicas e biológicas adequadas à sua utilização para determinado uso. Para cada uso da água é

necessário estabelecer as exigências relativas à sua qualidade, isto é, definir parâmetros de qualidade e estabelecer os seus valores-limite [7].

O objetivo da qualidade a estabelecer depende da utilização que for destinada à água e são quantificados através de indicadores de qualidade. Para avaliar a importância da qualidade da água, seja água potável ou água natural de rios, existem certas questões que se devem colocar ao analisar uma água [6]. A água é segura para se beber? Os peixes e outras espécies aquáticas podem viver e desenvolver-se (prosperar) em rios e lagos que são afetados por atividade humanas? O que é a qualidade da água? A resposta a estas perguntas é fundamental para nos ajudar a entender a importância de analisar uma água e saber que critérios são importantes determinar para avaliar a qualidade dessa água [11].

Os impactos no ambiente provocados pelo aumento da produção e do consumo de bens e serviços têm vindo a crescer de forma significativa nas últimas décadas. Efetivamente, a maioria dos problemas ambientais resulta de pressões das diversas atividades económicas. Exemplo disto é a poluição e a degradação da qualidade da água, causada pela agricultura e pela indústria [10].

2.2. Critérios da qualidade de água

É necessário conhecer a utilização que se pretende para uma determinada água, para se identificar os parâmetros que a caracterizam e lhe conferem o grau de qualidade requerido através de normas e diretrizes e concluir se determinada impureza é ou não contaminante [8].

A Lei da Água estabelece o enquadramento para a gestão das águas superficiais, designadamente as águas interiores, de transição e costeiras, e das águas subterrâneas, de forma a:

- Evitar a continuação da degradação e proteger e melhorar o estado dos ecossistemas aquáticos e também dos ecossistemas terrestres e zonas húmidas diretamente dependentes dos ecossistemas aquáticos, no que respeita às suas necessidades de água;
- Promover uma utilização sustentável da água, baseada numa proteção a longo prazo dos recursos hídricos disponíveis;

- Obter uma proteção reforçada e um melhoramento do ambiente aquático, nomeadamente através de medidas específicas para a redução gradual e a cessação ou eliminação por fases das descargas, das emissões e perdas de substâncias prioritárias;

- Assegurar a redução gradual da poluição das águas subterrâneas e evitar o agravamento da sua poluição;

- Mitigar os efeitos das inundações e das secas;

- Assegurar o fornecimento em quantidade suficiente de água de origem superficial e subterrânea de boa qualidade, conforme necessário para uma utilização sustentável, equilibrada e equitativa da água;

- Proteger as águas marinhas, incluindo as territoriais;

- Assegurar o cumprimento dos objetivos dos acordos internacionais pertinentes, incluindo os que se destinam à prevenção e eliminação da poluição no ambiente marinho [10].

As substâncias dissolvidas mais comuns na água são minerais, sais e sólidos dissolvidos como cálcio, sódio, bicarbonato e cloreto, nutrientes de plantas como o azoto e fósforo, e elementos vestigiais tais como selénio, crómio e arsénio [11]. Os minerais, sais e sólidos dissolvidos, embora não sejam considerados prejudiciais para a saúde humana, podem afetar o sabor, o cheiro ou a cor da água. Relativamente aos nutrientes e aos elementos vestigiais, estes já podem ser prejudiciais tanto para a saúde humana como para a vida aquática, se estes excederem as normas e diretrizes [11].

Os gases dissolvidos mais comuns em águas naturais são o oxigénio e o rádón. É necessário um nível de oxigénio adequado para a vida dos peixes e outras espécies marinhas. Em relação ao rádón, este gás pode ser prejudicial à saúde humana se estiver presente em águas potáveis em grandes quantidades [11].

3. Poluição da água

A vida e a atividade das plantas e animais, incluindo seres humanos, contribuem para a poluição do planeta Terra [12]. A poluição química das águas de superfície representa uma ameaça para o ambiente aquático, com efeitos como toxicidade aguda e crónica para os organismos aquáticos, acumulação no ecossistema e perdas de

habitats e de biodiversidade, além de constituir uma ameaça para a saúde humana. As causas da poluição deverão ser identificadas e as emissões deverão ser tratadas na fonte, com carácter de prioridade, da maneira mais eficaz em termos económicos e ambientais [13].

A poluição da água pode ser definida como: a inadequação da sua utilização para algum objetivo considerado ou qualquer modificação natural ou artificial que direta ou indiretamente modifique, altere ou destrua o equilíbrio dos ecossistemas e dos recursos naturais de tal modo que traga perigo para a saúde pública, diminua a sua adequabilidade ou eficiência e o bem-estar do Homem e das suas comunidades, ou ainda a alteração da composição ou do estado da água de tal forma que se torne menos adequada para todas ou algumas das funções e fins a que pode ser adequada no seu estado natural. O conceito de contaminação é definido como a introdução ou descarga na água de organismos patogénicos ou de substâncias tóxicas que a tornem imprópria para consumo público e/ou usos domésticos, ou seja, a contaminação pode ser considerada um aspeto específico da poluição [7].

O forte consumismo das nossas sociedades está a levar à emissão de poluentes para os oceanos, rios, aquíferos subterrâneos e atmosfera que podem influenciar significativamente o equilíbrio do ciclo da água [6]. A poluição das águas e do solo constitui-se num dos mais sérios problemas ecológicos decorrentes da atividade humana na atualidade [14].

Nas indústrias em que a água utilizada, independentemente de ser proveniente de um sistema de tratamento de água ou de um poço, entre em contacto com algum processo da indústria ou produto químico usado, pode contaminar esta água. Esta água passa a ser classificada de água residual. As águas residuais industriais são constituídas por poluentes físicos, químicos e/ou biológicos, que são difíceis de quantificar, por não se saber em que quantidade ou forma se encontram [12]. A água proveniente da atividade humana doméstica, não constitui um problema tão grande de poluição como as indústrias, pois os poluentes existentes nessa água são maioritariamente biológicos e, por isso, são facilmente biodegradados [12].

Por fim, outra fonte importante de poluição das águas é a agricultura. As águas residuais provenientes da agricultura podem ter origem animal ou vegetal, ou de nutrientes, fertilizantes, pesticidas ou herbicidas. As de origem animal ou vegetal são facilmente biodegradáveis, enquanto as outras não e apresentam um problema maior na poluição da água. Os nutrientes e fertilizantes geralmente têm formulações de carbono, fósforo, azoto e/ou metais vestigiais. Os pesticidas e herbicidas têm

formulações de químicos orgânicos, de estruturas moleculares bastante complexas, criadas para serem muito persistentes no ambiente [12].

A água subterrânea representa a massa de água doce mais sensível e importante, sendo uma fonte essencial de abastecimento público de água potável em muitas regiões e também é muito suscetível de deterioração e de poluição química [15]. Na figura 2, estão ilustradas algumas fontes de poluição de águas subterrâneas.

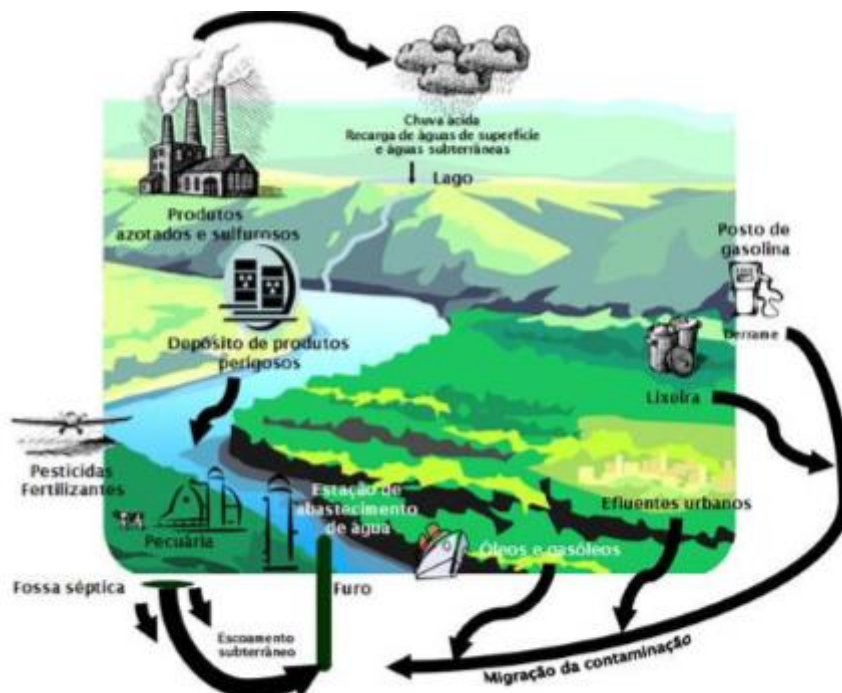
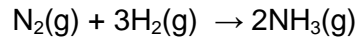


Figura 2: Poluição da água subterrânea por diferentes origens, adaptado de [15]

Os poluentes podem ser inorgânicos, orgânicos e biológicos, incluindo-se os microrganismos neste último grupo. Neste presente trabalho, os poluentes que requerem uma maior atenção são os compostos de azoto: o anião nitrato, o anião nitrito e o catião amónio, que têm um papel muito importante em ciclos de nutrientes em ambientes aquáticos como o mar, lagos e rios [16]. Dos três compostos inorgânicos, o catião amónio e o anião nitrato surgem em maior concentração que o anião nitrito [14]. Por essas razões, no tratamento de águas de esgoto e de água potável, é muito importante a quantificação destes nutrientes do ponto de vista de controlo da qualidade da água [16].

3.1. Azoto

O azoto é um gás que ocupa cerca de 79% do volume da atmosfera e do qual todos os organismos têm necessidade. As emissões de compostos azotados na forma gasosa para a atmosfera contribuem para o aumento da poluição por anião nitrato das águas [17, 18]. Grandes quantidades de azoto são fixadas sinteticamente sob condições altas de temperatura e pressão, de acordo com a seguinte reação:



O azoto pode encontrar-se na água na forma de: azoto orgânico N; catião amónio NH_4^+ ; anião nitrato, NO_3^- e anião nitrito, NO_2^- . Todas as formas de azoto são interconvertíveis (Ciclo do Azoto). Na natureza o catião amónio e o azoto orgânico transformam-se primeiro em anião nitrito e posteriormente em anião nitrato.

Algumas das reações químicas mediadas por microorganismos mais importantes em ambientes aquáticos são as que envolvem compostos azotados [18]. Essas reações encontram-se sumarizadas no Ciclo do Azoto ilustrado na figura 3.

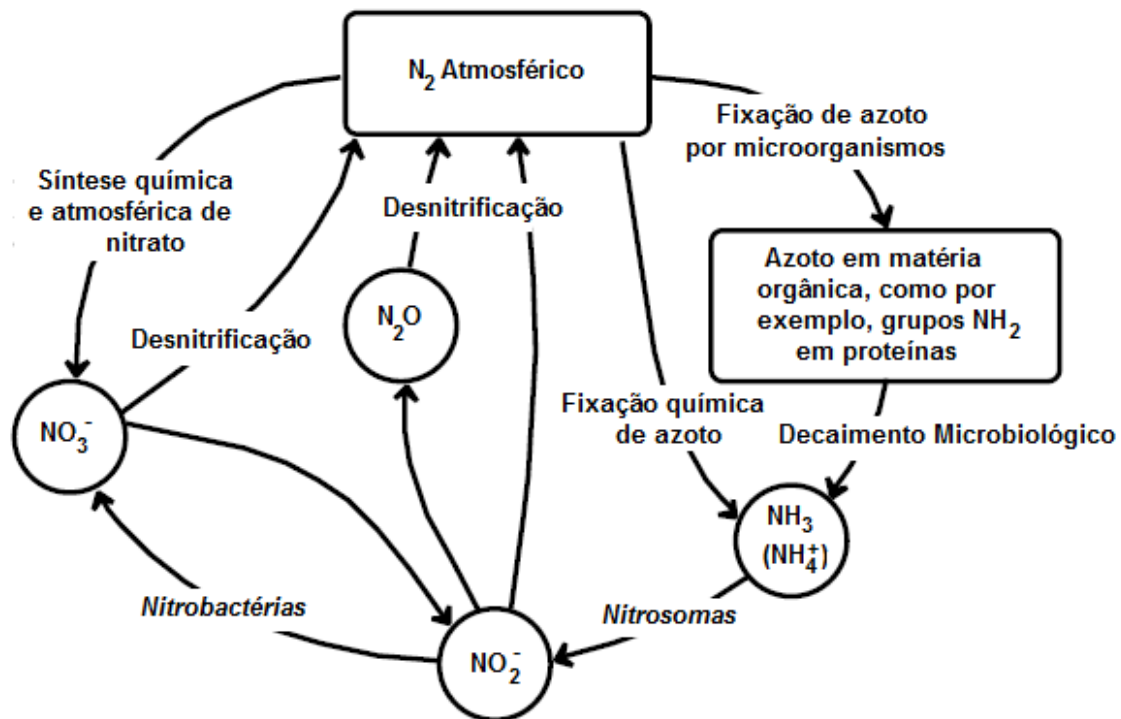


Figura 3: Ciclo do Azoto, adaptado de [18]

O Ciclo do Azoto descreve a dinâmica dos processos em que o azoto é convertido por matéria orgânica e compostos inorgânicos existentes na atmosfera. A desnitrificação é o processo no qual microorganismos produzem N_2 e N_2O gasosos que passam para a atmosfera e deste modo completam o ciclo do Azoto [18].

3.1.1. Aniã Nitrato

O aniã nitrato (NO_3^-) existe na biosfera por fontes naturais e processos feitos pelo homem e é um componente importante nos ciclos de vida biológicos [19]. O aniã nitrato é um contaminante muito comum em solos e cursos de água e é muito importante saber a sua quantidade, tanto em termos ambientais como para a saúde humana, pois pode ser tóxico se este ultrapassar determinados limites [20].

Apesar de haver protocolos desde 1980 para diminuir este ião, continua a haver uma preocupação no seu efeito. A contaminação ambiental pelo aniã nitrato é resultado da sua lixiviação em solos, causada pelo uso de fertilizantes [21]. Além disso, efluentes urbanos podem contribuir com até 40% do aniã nitrato presente em águas superficiais e solos [22].

O aniã nitrato é o produto final de oxidação do ciclo do azoto em águas naturais e é considerado o único composto de azoto termodinamicamente estável em águas aeróbias [23]. O aniã nitrato é formado pela nitrificação, que ocorre em duas etapas. Na primeira o NH_4^+ é convertido a NO_2^- , na segunda o NO_2^- é oxidado a NO_3^- por nitrobactérias. O aniã nitrito contém azoto num estado oxigenado relativamente instável [17]. A nitrificação não ocorre a temperaturas abaixo de 4°C e é maximizada entre 25 e 40°C , dependendo da região [14].

A toxicidade do aniã nitrato é principalmente atribuível à sua redução a aniã nitrito e o maior efeito biológico do aniã nitrito em humanos é o seu envolvimento na oxidação da hemoglobina (Hb) a metahemoglobina (metHb). Concentrações de aniã nitrato elevadas causam meta-hemoglobinémia severa em recém-nascidos e adultos [17].

3.1.2. Aniã Nitrito

Águas naturais não poluídas não apresentam aniã nitrito ou se apresentarem, é em concentrações muito baixas ($<0,1 \text{ mg/L}$), pois são rapidamente oxidados a aniã nitrato por ação de nitrobactérias. A sua presença denota contaminação bacteriana na água e é indicadora de um deficiente estado sanitário das águas [6].

O aniã nitrito é uma espécie química muito versátil e com muitas aplicações na indústria, tanto têxtil, como corante, ou alimentar, como meio de conservação dos alimentos. O aniã nitrito é capaz de produzir nitrosaminas carcinogénicas no corpo humano através da sua reação com aminas ou amidas [20, 24]. Este composto é um

dos poluentes encontrados na atmosfera e também em águas naturais, o que é tóxico para peixes, e é um intermediário importante no ciclo biológico do azoto [25].

Vestígios de anião nitrito e anião nitrato em água potável podem levar a metemoglobinemia em crianças e se houver uma exposição a longo prazo, pode causar o risco de cancro [20, 26]. O anião nitrito é um produto intermediário na redução microbiana de anião nitrato ou na oxidação de catião amónio. Também pode ser originado a partir de excreções de fitoplâncton como um resultado da redução do excesso assimilado [23].

3.1.3. Catião Amónio

Na gama de pH da grande parte das águas naturais, a forma predominante do par ácido-base $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ é o catião amónio e está presente naturalmente em algumas nascentes de água [21, 27]. O catião amónio é uma das principais formas de azoto inorgânico dissolvido na água do mar e desempenha um papel importante em ecossistemas marítimos, e é proveniente maioritariamente de fertilizantes e da degradação de resíduos de origem animal ou vegetal. Um grande aumento na sua concentração pode ser tóxico para os peixes e outras espécies marinhas [25].

Em ambientes aeróbicos, como na superfície de lagos, o azoto existe na forma de anião nitrato, enquanto em ambientes anaeróbios, existe sobre a forma de catião amónio [12]. Em concentrações elevadas, por exemplo, na água de consumo, pode causar danos graves nos humanos e animais, já que o catião amónio interfere no transporte do oxigénio pela hemoglobina. A nível ecológico também tem bastantes implicações, influenciando a quantidade de oxigénio dissolvido na água o que faz com que haja inúmeras alterações metabólicas nos seres vivos aquáticos.

4. Legislação sobre a qualidade de água

Em Portugal, a Lei da Água estabelece normas, critérios e objetivos da qualidade com a finalidade de proteger o meio aquático e melhorar a qualidade das águas em função dos fins a que se destinam. O Decreto-Lei n.º 236/98 de 1 de agosto estabelece um grande número de valores guia designados de Valor Máximo Recomendado (VMR) e Valor Máximo Admissível (VMA) para a água. O VMR é o teor, concentração ou valor da norma da qualidade que, de preferência, deve ser respeitado ou não excedido. Por outro lado, VMA é o teor, concentração ou valor da norma da qualidade que não deve, em caso algum, ser ultrapassado, sob risco de poder haver

contaminação [4, 6]. A legislação também refere os valores limite de cada parâmetro que deve ser analisado para avaliar a qualidade da água e quais os métodos de referência existentes para a sua determinação [8]. O VMA para a concentração de anião nitrato na água, segundo a nova diretiva relativa à proteção das águas e segunda a Legislação Europeia é de 50mg/L e o VMR 25mg/L. Embora alguns Estados-Membros estabeleçam os seus próprios limites, mais rigorosos, tendo em vista a boa qualidade das suas águas [17, 28]. Relativamente à concentração em anião nitrito, a Legislação Europeia estabeleceu um VMA de 0,1mg/L, e em relação à concentração em catião amónio, o VMA é de 0,5mg/L e o VMR 0,05mg/L. Estes valores encontram-se referenciados no Decreto-Lei nº236/98 de 1 de agosto [4, 29].

5. Métodos de análise

Para a caracterização de uma massa de água, as respetivas amostras têm de passar por um processo definido, desde a colheita até à determinação da concentração dos diferentes parâmetros. Neste existem três fases principais bem distintas, de igual importância: a recolha das amostras, a receção das amostras pelo laboratório e a análise das amostras [7].

Relativamente à recolha das amostras, o responsável por essa função deve ter as mãos e a roupa bem limpas. Os recipientes de colheita das amostras são de três tipos: de polietileno, de capacidade de 5L, para a maior parte das análises do laboratório, de polietileno de capacidade de 500mL, para a determinação de nutrientes e recipientes apropriados para microbiologia que estão todos devidamente esterilizados e encontram-se bem identificados com a amostra a ser recolhida. As amostras são colhidas para os recipientes, fazendo primeiro sempre uma lavagem prévia com a amostra a recolher. Após a recolha das amostras, estas são transportadas para o laboratório numa arca isotérmica com placas acumuladoras térmicas congeladas para manter as amostras a uma temperatura de cerca de 4°C. Após chegada das amostras ao laboratório, fazem-se as análises prioritárias que devem ser efetuadas no prazo de 24h, como é o exemplo do pH. Se alguma amostra apresentar muitos sólidos suspensos ou se encontrar turva, essa amostra deve ser filtrada antes de serem analisados determinados parâmetros.

Nos dias de hoje, há uma necessidade crescente em arranjar processos de análise para monitorizar águas naturais e residuais, relativamente a parâmetros como

o anião nitrato, anião nitrito, catião amónio, compostos fenólicos e sulfatos neste tipo de águas, devido ao uso de ácido sulfúrico nas indústrias, do aumento do uso de fertilizantes à base de azoto e, nos últimos anos, do uso excessivo de compostos fenólicos em pesticidas, herbicidas e fungicidas [30]. Neste trabalho os parâmetros analisados foram o anião nitrato, anião nitrito e catião amónio.

Segundo o Decreto-Lei nº236/98 de 1 de agosto, relativamente à qualidade de águas, existem várias técnicas de análise descritas para cada parâmetro a analisar [4]. Para a análise de anião nitrato em águas naturais e residuais estão descritas as técnicas de espectrofotometria de absorção molecular, cromatografia iónica e o uso de elétrodos seletivos. Relativamente à análise de anião nitrito, as técnicas descritas são espectrofotometria de absorção molecular e cromatografia iónica, e, por último, na análise de catião amónio, estão descritas as técnicas de espectrofotometria de absorção molecular e volumetria.

No âmbito deste trabalho, a técnica usada foi espectrofotometria de absorção molecular, associada à análise em fluxo, no UV-Visível na análise dos iões nitrato, nitrito e amónio.

5.1. Fundamentos dos métodos

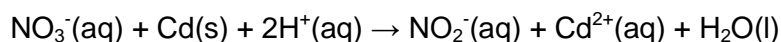
5.1.1. Anião Nitrato

O anião nitrato é um dos aniões mais determinado em amostras de água natural e água potável, devido à sua toxicidade tanto para animais como humanos dependendo da sua concentração, o que faz com que seja muito importante a sua deteção e quantificação [31, 32]. Geralmente o anião nitrato é determinado sob a forma de anião nitrito e é baseada no método de Morris e Riley (1963) e modificado por Strickland e Parsons (1968). A amostra é diluída num tampão de cloreto de amónio/amoniaco (pH=8,2) e bombeada através de uma coluna de cádmio, na qual se dá a redução do ião nitrato a ião nitrito. Como os produtos da reação e a cinética são dependentes do pH, a reação deve ser tamponada [33].

O anião nitrito produzido é então determinado por diazotização com sulfanilamida e N-(1-naftil)-etilenodiamida dihidratada formando um composto corado. A absorvância é medida a 540 nm e o valor de concentração obtido deve ser corrigido devido a anião nitrito presente inicialmente na amostra, este valor é obtido subtraindo a quantidade de anião nitrito presente na amostra à quantidade total obtida da redução de nitrato [31]. Obtendo o valor de absorvância a 540nm, obtemos o valor da

concentração em anião nitrito pela reta de calibração feita no início da análise. As seguintes equações estequiométricas são aplicadas:

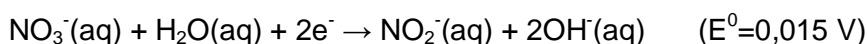
Redução do anião nitrato usando uma coluna de cádmio:



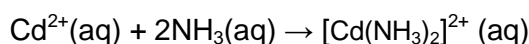
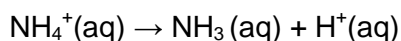
O NO_3^- pode ser facilmente reduzido a NO devido às forças eletromotrizes (E^0) semelhantes das reações:



De modo a assegurar que isto não ocorre, a reação é feita numa solução neutra ou ligeiramente alcalina.



O cloreto de amónio nas amostras atua como complexante e tampão.

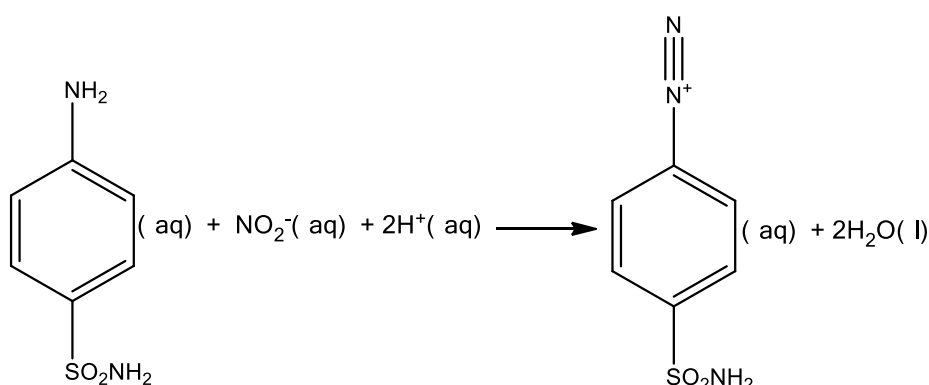


As reações de diazotização e formação do composto corado usando sulfanilamida e N-(1-naftil)-etilenodiamida dihidratada, encontram-se no ponto 5.1.2..

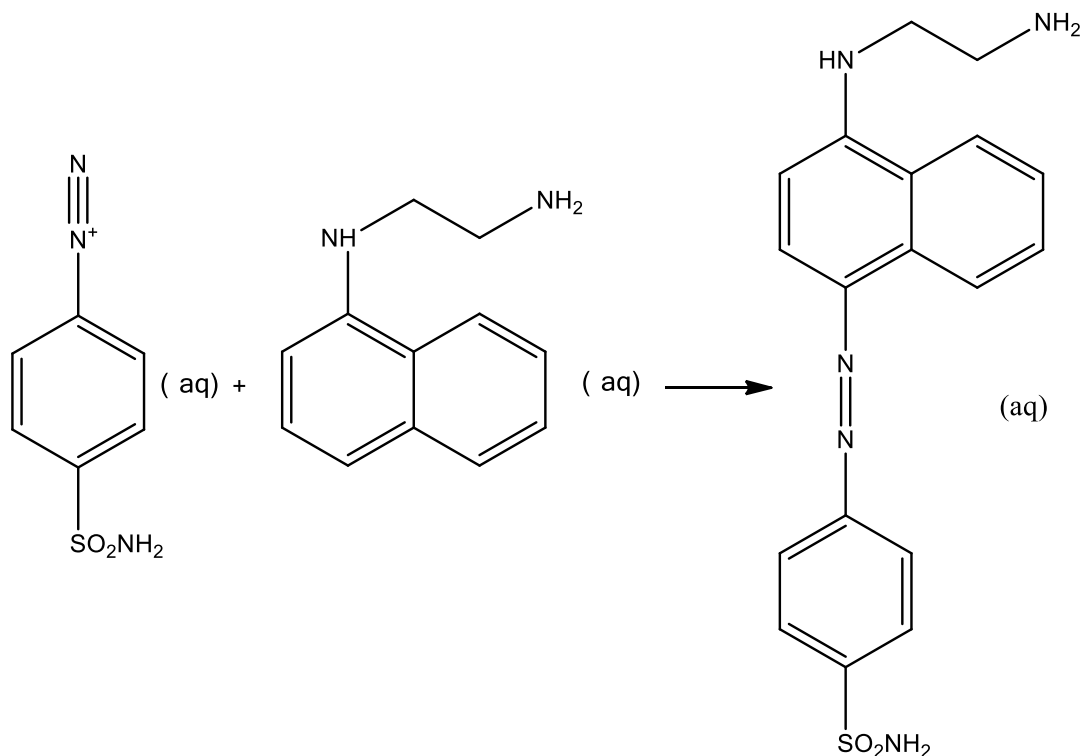
5.1.2. Anião Nitrito

Este procedimento automatizado para a determinação de anião nitrito é uma adaptação do método de diazotização. Em condições ácidas, o anião nitrito é determinado por diazotização com sulfanilamida e N-(1-naftil)-etilenodiamida dihidroclórica formando um composto corado. A absorvância é medida a 540 nm e é proporcional à concentração em anião nitrito. As seguintes equações representam as reações associadas.

Reação de diazotização em meio ácido:



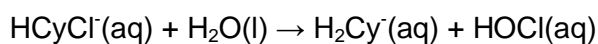
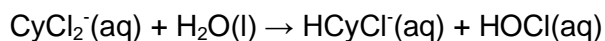
Reação da p-diazo sulfanamida com o N-(1-naftil) etilenodiamina, dando origem a um composto corado.



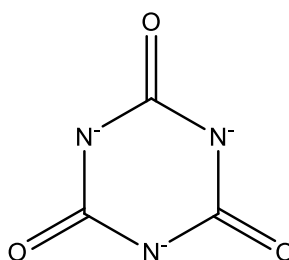
5.1.3. Catião Amónio

A amostra é diluída com uma solução tampão para complexar os catiões. Depois, adiciona-se um catalisador, nitroprussiato de sódio, juntamente com salicilato de sódio, e um composto cloroativo, dicloroisocianurato, para formar um complexo corado [34, 35]. A absorvância é medida a 660nm e o valor máximo da banda está relacionado com a concentração de azoto proveniente de NH_3 e NH_4^+ .

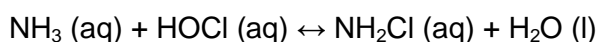
Hidrólise do dicloroisocianurato:



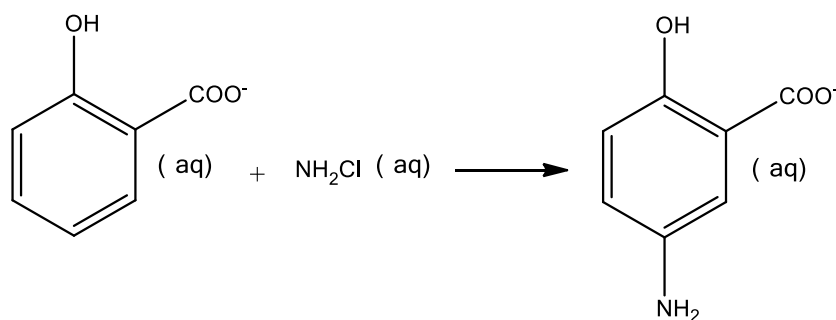
Em que Cy^{3-} corresponde a:



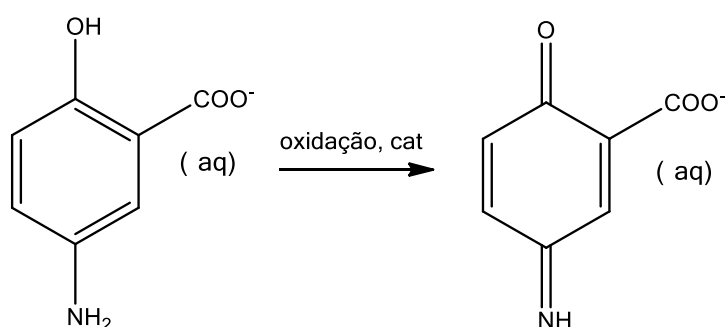
Formação da monocloramina (NH_2Cl), que é estabilizada a um pH de 12,1:



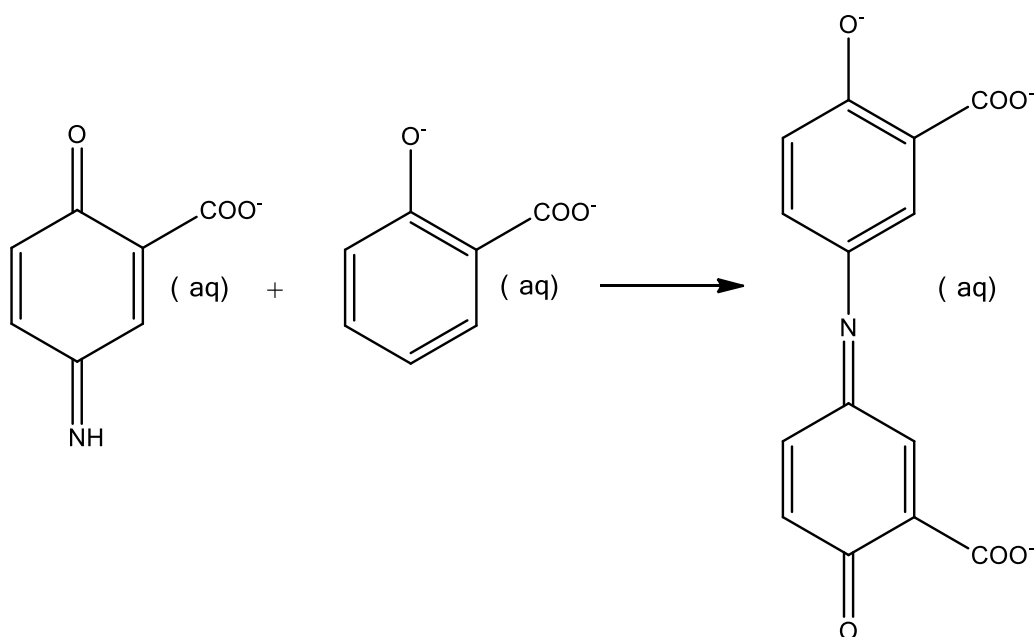
Reação do salicilato de sódio com a monocloramina:



Oxidação do 5-aminosalicilato catalisada pelo nitroprussiato de sódio (Na₂[Fe(CN)₅NO].2H₂O).



Reação de formação de um complexo corado azul, que na presença de excesso de catalizador, nitroprussiato de sódio de cor amarela, origina uma solução de cor verde [35, 36].



As amostras para a determinação do catião amónio, devem ser analisadas após colheita ou até no máximo 24h depois.

5.2. Espectrofotometria de absorção molecular no UV-visível

A espectrofotometria na zona do Ultravioleta-Visível é originada por transições eletrónicas, é menos específica que o Infravermelho e utiliza equipamentos geralmente mais baratos. A espectrofotometria na zona do visível e ultravioleta é um dos métodos analíticos mais usados em determinações analíticas em diversas áreas e aplica-se na determinação de compostos orgânicos e inorgânicos [37].

A espectroscopia de absorção molecular também pode ser utilizada na identificação de grupos funcionais numa molécula. A região ultravioleta do espectro é na faixa de 200 a 400nm, e a região do visível é entre os 400 e os 800nm [37]. As energias correspondentes a estas regiões são na ordem dos 150 a 72 kcalmol⁻¹ na região ultravioleta e de 72 a 36 kcalmol⁻¹ na região visível.

De um ponto de vista prático, a determinação da quantidade de luz que é absorvida por uma amostra é descrita pela *lei de Beer- Lambert*, em que a relação entre a intensidade da luz incidindo numa solução (I_0), e a intensidade da luz saindo da solução (I), é relacionada pela expressão seguinte [38].

$$\text{Log } (I_0 / I) = A = \epsilon c l$$

A = absorvância

ϵ = absortividade molar ou coeficiente de extinção

c = concentração do material absorvedor

l = espessura da amostra através da qual a luz passa.

Para registar os dados de absorvância ou transmitância obtidos é necessário um instrumento chamado espectrofotómetro [39]. Este instrumento regista os dados de absorvância ou transmitância em função do comprimento de onda e o gráfico que origina é chamado de espectro de absorção ou espectro de transmissão, dependendo do que é registado, se é a absorvância ou transmitância, respetivamente [37].

Um espectro de absorção é característico para cada espécie química, sendo possível identificar uma espécie química através do seu “espectro de absorção”.

Os espectrofotómetros geralmente têm 5 componentes principais: a fonte de radiação, o monocromador, compartimentos que contém as amostras e soluções, detetores, e, por fim, um dispositivo de processamento de dados [39]. Na figura 4 encontram-se esquematizados os componentes principais de um espectrofotómetro.

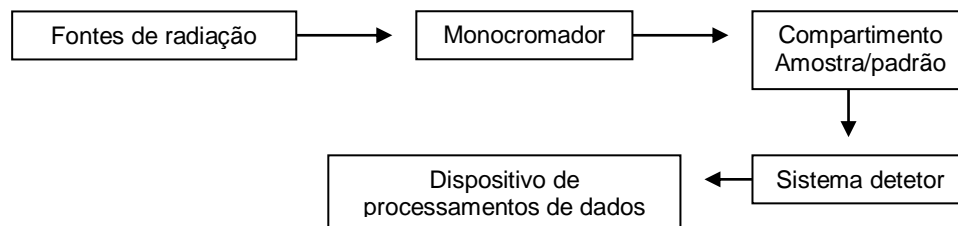


Figura 4: Esquema dos componentes principais de um espectrofotómetro

5.2.1. Componentes do espectrofotómetro

Um dos principais componentes de um espectrofotómetro é a fonte de radiação. As fontes de radiação mais comuns baseiam-se na incandescência e são muito usadas no infravermelho e no visível. As fontes de radiação geralmente são constituídas por filamentos de materiais que são excitados por descargas elétricas de elevada voltagem ou por aquecimento elétrico [38].

De modo a que uma fonte de radiação seja considerada de boa qualidade, tem de ter certas características, tais como:

- Gerar radiação contínua, isto é, ser capaz de emitir em todos os comprimentos de onda, dentro da região pretendida;
- Ter intensidade de potência radiante suficiente para permitir a sua deteção pelo sistema detetor do aparelho;
- Ser estável ao longo do tempo, isto é, ter uma potência radiante constante;
- E, por último, ter uma vida útil longa e ser de custo baixo.

Existem vários tipos de fonte de radiação, entre as quais as seguintes:

- Lâmpada de filamento de tungstênio: é incandescente e produz emissão contínua na faixa de 320 a 2500nm. O invólucro de vidro absorve toda a radiação abaixo dos 320nm, limitando o uso da lâmpada para o visível e infravermelho.
- Lâmpada de quartzo-iodo: é incandescente e o invólucro de quartzo emite radiação de 200 a 3000nm. A vantagem desta lâmpada é poder ser utilizada na região do ultravioleta.
- Lâmpada de descarga de hidrogénio ou de deutério: esta é a lâmpada mais utilizada para emissão de radiação ultravioleta. Esta lâmpada consiste num par de elétrodos fechados num tubo de quartzo ou de vidro, com uma janela de quartzo preenchida com gás de hidrogénio ou deutério. O funcionamento desta lâmpada

consiste em aplicar uma alta voltagem que produz uma descarga de eletrões que excitam outros eletrões gasosos a níveis energéticos superiores.

Outro componente importante num espectrofotómetro é o monocromador. Os monocromadores são dispositivos que têm como função selecionar o comprimento de onda adequado para a análise pretendida. Este é constituído por uma fenda de entrada, de um elemento de dispersão e de uma fenda de saída, em que o objeto de dispersão consiste num prisma ou numa rede de difração [39].

Existem dois tipos de monocromadores mais usados, que são o monocromador prismático e o monocromador reticular.

- Monocromador prismático: a radiação policromática vinda da fonte de radiação passa pela fenda de entrada e incide sobre a face de um prisma, onde a luz é refratada e decomposta, como mostra a figura 5. Os prismas de quartzo são mais indicados para trabalhar na região ultravioleta, enquanto os de vidro são mais indicados na região do visível.

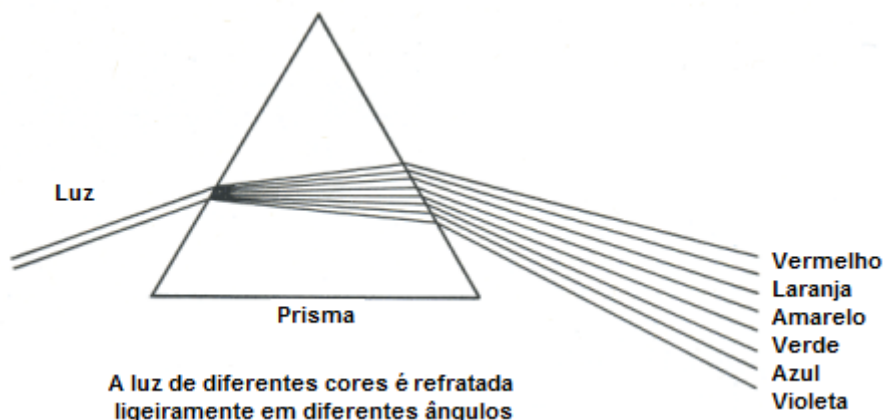


Figura 5: Luz a incidir num prisma sendo refratada em diferentes ângulos

- Monocromador reticular: o principal elemento de dispersão deste tipo de monocromadores é a rede de difração, que consiste numa placa transparente com diversas ranhuras paralelas e com a mesma distância. As redes de difração possuem melhor resolução que os prismas e podem ser utilizadas em todas as regiões espectrais.

Para os compartimentos que contêm as amostras e outras soluções, o material mais utilizado para este fim são as cubas de vidro ou de quartzo [38]. As cubas de vidro são mais utilizadas quando se trabalha na região do visível, enquanto as de

quartzo são mais usadas na região do ultravioleta, visto serem transparentes a radiação ultravioleta e o vidro não, absorvendo nesta região. Uma das vantagens das cubas de vidro relativamente às de quartzo é o seu baixo preço. As cubas geralmente têm 1cm de espessura para simplificar no cálculo da expressão de Beer-Lambert, porém, também podem existir cubas com espessuras diferentes [38].

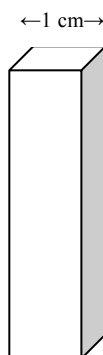


Figura 6: Cuba tradicional

Para aplicações industriais onde o número de amostras é elevado, não são utilizadas cubas individuais nem as amostras são analisadas individualmente, mas sim um sistema automatizado, com vários compartimentos para a análise de várias amostras em simultâneo, designado por análise em fluxo.

5.3. Análise em Fluxo

A crescente necessidade de automatização de procedimentos analíticos deve-se ao aumento significativo do número de amostras laboratoriais que necessitam ser analisadas, como por exemplo, nas áreas clínicas e ambientais, e à procura por técnicas rápidas e de confiança que possam operar 24 horas por dia, que normalmente são necessárias no controlo de processos industriais. Apesar dos esforços para desenvolver sensores seletivos e sensíveis para determinar diretamente a concentração de um analito numa amostra, a grande variedade de analitos e a complexidade dos produtos a serem analisados tornam altamente improvável que existam sensores seletivos para a maioria dos compostos de interesse num futuro próximo. Desta forma, a separação e/ou conversão química mantêm-se como etapas essenciais na maioria dos procedimentos de análise quantitativa. Nestes casos, a automatização dos procedimentos analíticos implica a automatização do processamento das amostras. As análises automatizadas têm vindo a tornar-se rotina em laboratórios nas últimas décadas [40].

Existem variadas análises em fluxo, como ilustradas na figura 7, sendo estas classificadas consoante a amostragem é contínua ou intermitente, se se trata de fluxo contínuo ou segmentado e a forma como a amostra entra no processo, se é aspirada ou se injetamos a amostra.

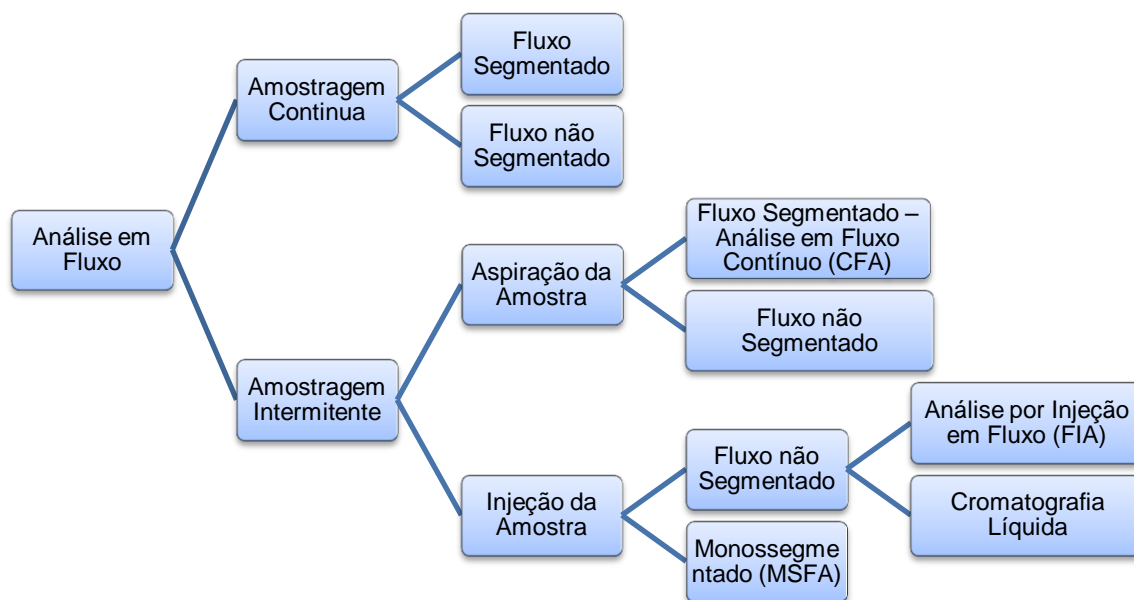


Figura 7: Tipos de análise em fluxo

No presente trabalho foi usada a análise por fluxo contínuo segmentado.

5.3.1. Fluxo contínuo segmentado

A análise por fluxo contínuo segmentado, designada por CFA (continuous flow analysis) ou também por SFA (segmented flow analysis), foi desenvolvida em 1950 por Leonard Skeggs [41]. Esta análise é referente a qualquer processo em que a concentração de um analito é medida através de uma corrente de líquido ou gás [42]. Algumas das vantagens de analisadores de fluxo contínuo são a sua simplicidade de automatizar, usam pouca solução, na ordem dos μL , funciona em sistema fechado, o que minimiza perdas por evaporação e minimiza a contaminação [43].

Em análise por fluxo contínuo, genericamente, uma corrente de líquido é dividido, por bolhas de ar, em pequenos segmentos onde ocorre a reação química. As amostras e reagentes são transportados neste fluxo/corrente contínua, através de tubagens e passam por locais onde ocorre a mistura de ambos [44]. As diferentes tubagens conduzem a amostra para diferentes locais, antes de ser detetado o analito de interesse, locais esses que podem realizar diferentes tarefas, como por exemplo,

destilação, extração, aquecimento, entre outros, dependendo dos processos a que a amostra tem de ser submetida [44].

A principal característica que difere esta análise das outras análises em fluxo é a introdução de bolhas de ar no sistema. As bolhas de ar têm como função dividir a amostra em diferentes segmentos e servem como barreira entre os segmentos de modo a minimizar contaminações. Estas bolhas de ar ao criar turbulência, também ajudam na mistura das amostras com os reagentes.

Neste método há vantagens e desvantagens, uma das grandes vantagens é a possibilidade de determinar vários componentes em simultâneo, por ser mecanizado, aumenta a precisão dos resultados e minimizam erros humanos, mas por outro lado, duas desvantagens são o facto de poder haver intercontaminação de amostras - efeito de memória, e os sistemas podem ser complexos, com várias linhas de fluxo que requerem sincronização para aspirar a amostra, os reagentes, o ar e as soluções de lavagem [43].

Um analisador de fluxo contínuo é constituído por diferentes módulos, um amostrador, uma bomba, "mixing coils", tratamentos de amostra opcionais (destilação, aquecimento...), um detetor e um gerador de dados, normalmente um software específico do equipamento, como se pode verificar na imagem 8. A maioria dos equipamentos que utiliza este método de análise depende de reações que produzam compostos corados, que serão detetados num fotómetro, de acordo com o seu comprimento de onda [44].

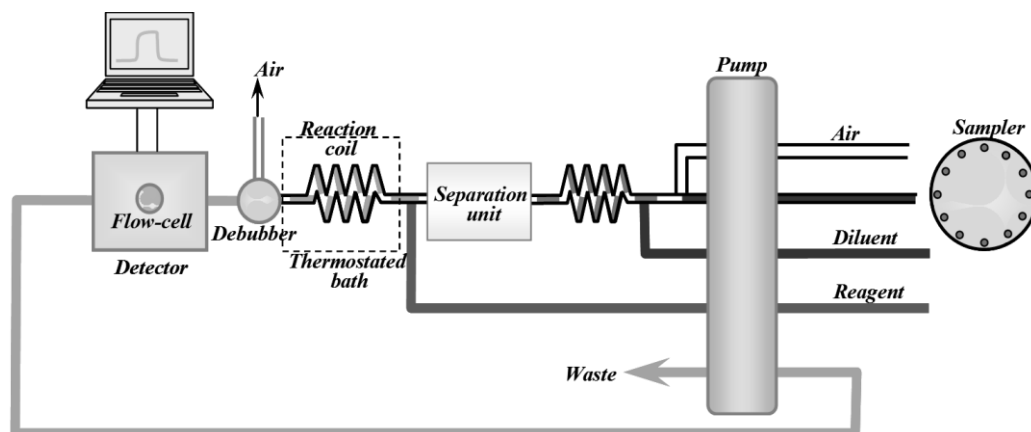


Figura 8: Análise em fluxo contínuo segmentado, adaptado de [42]

5.4. Autoanalisador

Existem inúmeras vantagens do uso de métodos automatizados, como maior velocidade no processamento das análises, maior confiança nos resultados,

minimização de contaminações por parte humana, diminuição de resíduos e um menor consumo de amostras e reagentes.

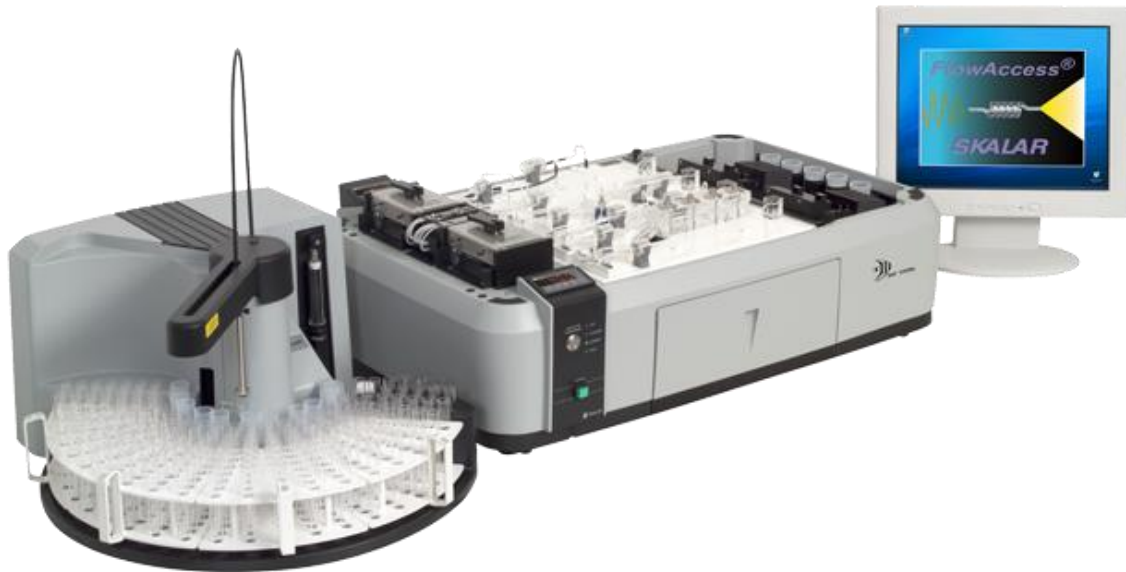


Figura 9: Autoanalizador SKALAR, adaptado de [45]

O autoanalizador SKALAR, ilustrado na figura 9, é um equipamento que permite a análise simultânea de diversos nutrientes em amostras de águas, usando a análise em fluxo contínuo segmentado. O autoanalizador é capaz de analisar nutrientes de um modo automatizado, em que as amostras e os reagentes entram no sistema e formam compostos corados cuja intensidade de cor é lida num detetor próprio incorporado no sistema (a dois comprimentos de onda distintos, sendo um destes utilizado para minimizar efeitos de matriz). O fluxo segmentado é obtido por inserção de bolhas de ar no percurso da reação, diminuindo assim o efeito de difusão e aumentando a sensibilidade do método.

A quantificação dos nutrientes é efetuada recorrendo a um software próprio, por análise de curvas de calibração preparadas com padrões dos nutrientes a analisar. As curvas de calibração são contruidas dentro do intervalo de linearidade de concentrações dos nutrientes a analisar, previamente estabelecidas [33].

Este equipamento permite analisar um elevado número de amostras em sequência, dispondo de um amostrador com 72 posições para amostras e 10 posições para padrões, permitindo a análise de cerca de 20 amostras por hora. Devido a dispor de 10 posições para padrões, este equipamento permite a análise de dois ou mais nutrientes em simultâneo.

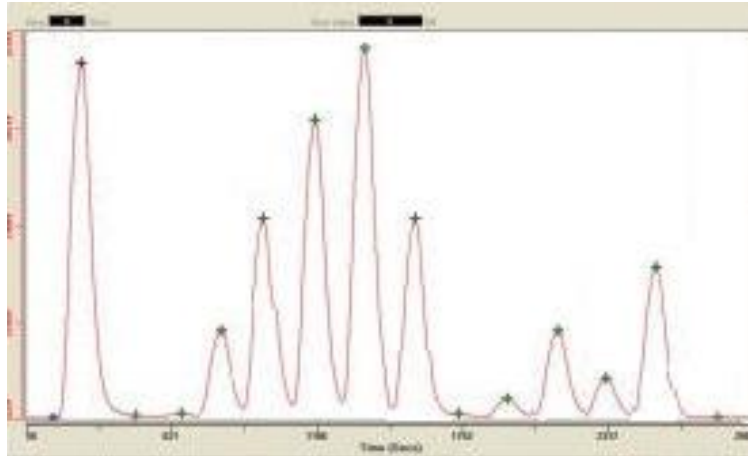


Figura 10: Gráfico exemplo de uma análise no autoanalisador com a curva de calibração e amostras

Na figura 10, pode-se ver o resultado de uma análise feita pelo autoanalisador, em que a fase inicial é comum em todas as análises, que corresponde à construção da curva de calibração. Obtém-se um primeiro pico referente ao padrão de concentração mais elevada de modo a poder verificar-se de imediato se o equipamento está a funcionar corretamente. Então surgem os picos referentes aos padrões da curva de calibração, neste caso de 5 padrões, de modo a obter-se a equação da reta para quantificar as amostras analisadas em seguida.

Depois de analisados os padrões, surgem os picos das amostras que se encontram, no exemplo da figura 10, dentro da gama de concentração da curva de calibração.

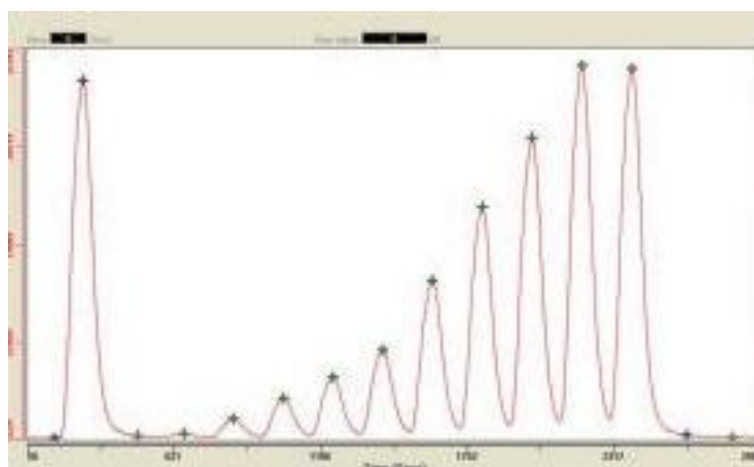


Figura 11: Gráfico exemplo de uma análise no autoanalisador comparando a altura do pico de concentração mais elevada da curva de calibração com amostras de concentração variável

Na figura 11 podemos ver um primeiro pico que é referente ao padrão mais concentrado da curva de calibração, e os picos seguintes sendo de amostras cada vez

mais concentradas até atingirem a altura do pico do padrão mais concentrado. Este exemplo não corresponde a um caso real, é apenas de modo a ilustrar a gama de concentrações das amostras. Podemos ver que as alturas dos picos das amostras são mais baixas que a do padrão e que os picos se encontram bem definidos. Isto corresponde a uma análise bem sucedida, sendo todas as amostras quantificadas de imediato, sem ser necessárias diluições.

Apesar da eficiência deste aparelho, existem alguns problemas quando se analisam amostras de concentração muito superior à concentração do padrão mais elevado da reta de calibração, como exemplificado em seguida. Quando estamos perante amostras mais concentradas que o nosso padrão mais elevado, estamos perante dois resultados possíveis, um para o caso da amostra ser mais concentrada, mas numa percentagem não muito superior, e outro para o caso da amostra ser muito mais concentrada. Apenas o segundo caso afeta os resultados obtidos.

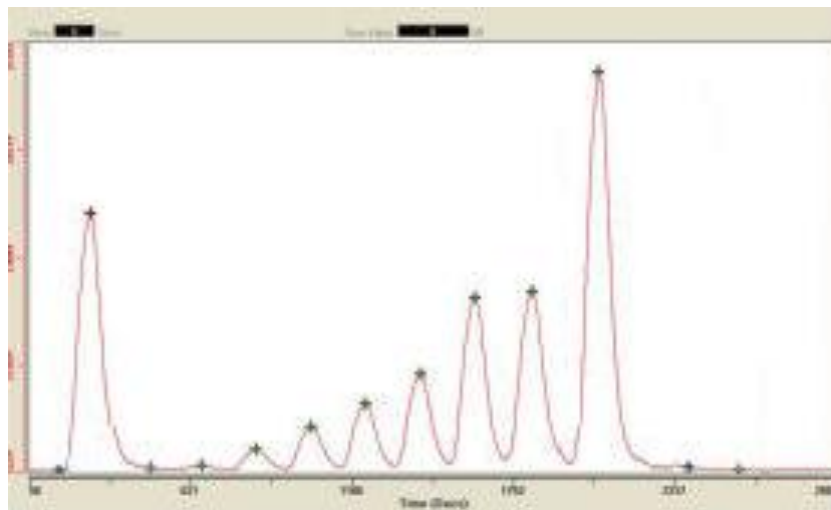


Figura 12: Gráfico exemplo de uma análise no autoanalisador com amostra muito concentrada, mas sem afetar os resultados obtidos

Como se pode ver pela figura 12, podemos verificar que uma amostra obteve um pico mais elevado que o pico do padrão mais concentrado da curva de calibração. Neste caso a amostra não afetou os resultados e para quantificá-la, basta fazer uma diluição adequada.

Pela análise da figura 13, obtemos novamente um pico de uma amostra muito concentrada, mas numa percentagem superior ao do caso anterior, que além de ser de altura muito superior à do pico do padrão de concentração mais elevada, também

tem uma largura superior, este facto faz com que o pico da amostra seguinte não se encontre bem separado do pico da amostra muito concentrada e, por esta razão, o valor obtido para esta amostra esteja incorreto. Uma possível correção seria alterar as definições do método, de modo a haver um maior tempo de espera entre amostras a fim de evitar estes problemas.

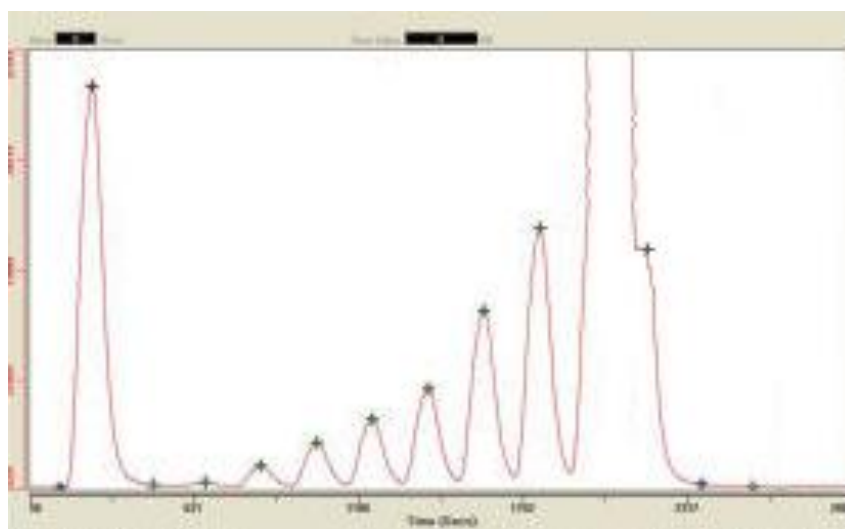


Figura 13: Gráfico exemplo de uma análise no autoanalisador com amostra muito concentrada em que a banda dessa amostra interfere na quantificação de outra amostra

6. Métodos analíticos (e sua validação)

Um método de análise necessita de validação quando: se trata de um novo método, um método já existente vai ser implementado pela primeira vez num determinado laboratório ou um método já existente vai ser utilizado mudando alguma característica, como a instrumentação ou a gama de concentrações que era utilizada. A validação de um método normalmente é um pré-requisito para a acreditação de laboratórios

6.1. Validação de métodos analíticos

A validação de um método analítico é um aspeto crucial na garantia da qualidade analítica, pelo que tem recebido uma atenção considerável por parte da comunidade científica, comités industriais e entidades reguladoras. Isso ocorre pela necessidade de uniformizar os critérios utilizados com o fim de demonstrar que um método de ensaio, nas condições em que é praticado tem as características necessárias para assegurar a obtenção de resultados com a qualidade exigida. Um método de ensaio é um processo que envolve manipulações suscetíveis de acumularem erros (sistemáticos e/ou aleatórios), o que, em algumas situações, pode alterar de forma significativa o valor do resultado final [46, 47].

Segundo a Norma NP EN ISO/IEC 17025, Validação é a confirmação, através de exame e apresentação de evidência objetiva, de que os requisitos específicos relativos a uma dada utilização são cumpridos [46].

O objetivo da validação de um método analítico é demonstrar que esse método é adequado para a análise dos objetivos propostos para esse método. A validação de um método tem de ser um estudo experimental e tem de ser documentado. Esta é definida por um processo contínuo de avaliação, desde o planeamento até à aplicação. Então, o princípio básico da validação de resultados é: “Um resultado para ser dado como válido tem de satisfazer os requisitos de qualidade que lhe sejam exigidos” [48].

A validação de um método é demonstrada a partir da análise de padrões e amostras com matriz semelhante ou idêntica à das amostras que vão ser analisadas posteriormente. É essencial que os estudos de validação sejam representativos de modo a assegurar que as concentrações utilizadas e os tipos de amostra sejam os

mais corretos. Nos laboratórios acreditados, é necessário estabelecer um bom procedimento de validação de métodos, mas ao mesmo tempo conciliar tempo e qualidade. É necessária uma validação rápida, sem perda de qualidade dos resultados, devido às restrições de tempo num laboratório, pelas análises de rotina e outras funções dos analistas.

Os parâmetros analíticos normalmente avaliados são: seletividade, linearidade e faixa de aplicação, precisão, exatidão, limite de deteção, limite de quantificação e robustez. Estes parâmetros são também conhecidos como parâmetros de desempenho.

6.1.1. Seletividade

Genericamente, uma amostra é constituída pelos analitos, a matriz e por outros componentes que podem ou não interferir na quantificação do analito de interesse. Um método é chamado de seletivo se tiver a capacidade de distinguir a resposta originada pelo analito de interesse, da resposta de outros analitos [49]. Por esta razão, a seletividade é o primeiro parâmetro analítico a ser estudado, pois se o método não for seletivo, a linearidade, a exatidão e a precisão estarão comprometidas [50, 51]. De uma maneira geral, a seletividade garante que a resposta obtida, na forma de pico em cromatografia, por exemplo, seja exclusivamente do analito de interesse.

A seletividade é o primeiro parâmetro a analisar na validação de um método e deve ser reavaliada continuamente durante a validação e durante o uso do método [50]. Diz-se que um método é seletivo quando permite discriminar o analito relativamente a outras substâncias, eventualmente presentes na amostra a analisar, ou seja, quando oferece garantias que a grandeza medida provém apenas do analito [52].

Esta pode ser obtida de diversas maneiras, por exemplo, comparando a matriz isenta do analito de interesse e a mesma matriz com o analito de interesse (padrão) ou utilizando o método de adição de padrão. Este último é muito utilizado quando não é possível obter uma matriz isenta de analito. O método de adição de padrão tem como fundamento utilizar uma série de amostras, com a mesma matriz, em que apenas varia a concentração do analito em proporções bem conhecidas e ao longo de toda a gama de trabalho [52]. No método da adição de padrão, aceitam-se valores entre 80%-120%

de percentagem de recuperação para o método ser seletivo. Em seguida encontra-se o modo de obter a percentagem de recuperação.

$$\% \text{Recuperação} = \frac{|AF| - |A|}{|P|} \times 100$$

Em que $|AF|$ é a concentração da amostra fortificada (adição de padrão), $|A|$ a concentração da amostra e $|P|$ o incremento de concentração esperado pela adição do padrão.

6.1.2. Linearidade

A linearidade é a capacidade de obter resultados diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo específico [50]. A relação entre o sinal obtido e a concentração do analito a quantificar, raramente é conhecida, por isso é importante obter uma curva analítica usando diferentes concentrações de analito, sob a forma de padrões, de modo a determinar a linearidade.

A equação da reta que relaciona as duas variáveis é:

$$y = a + bx$$

Sendo: y a resposta medida (absorbância, área do pico, etc.); x a concentração; a a interseção com o eixo y , quando $x = 0$ e, por fim, b como sendo a inclinação da curva analítica.

A correlação entre o sinal obtido e as concentrações é calculada a partir do coeficiente de correlação, R . Este parâmetro dá-nos informação acerca da qualidade da curva analítica obtida, em que o valor ideal é de 1, o que significa que há pouca dispersão entre os valores obtidos e uma menor incerteza, mas esta informação apenas não nos permite tirar conclusões.

A linearidade da curva de calibração deve ser avaliada através de um modelo estatístico, de acordo com a norma ISO 8466-1, de modo a verificar se a regressão linear é a mais adequada para o caso em estudo [53]. Com os valores de concentração e absorvância medidos, constrói-se um gráfico e fazem-se dois ajustes, um ajuste linear e um de polinómio de segundo grau. Após a construção de ambas as curvas de calibração, determinam-se as equações de modo a obter os desvios padrão de cada curva, sendo $S_{y/x}$ o desvio padrão da curva de calibração linear e S_{y2} o desvio

padrão da curva de calibração não linear. Com os valores obtidos usa-se o teste de Fisher de modo a verificar se a regressão linear é a mais adequada.

O F_{exp} é obtido a partir da razão da variância da curva de calibração não linear, S^2_{y2} pela diferença das variâncias dos dois tipos de ajustes, calculada a partir da equação:

$$\Delta S^2 = (N-2)S^2_{y/x} - (N-3)S^2_{y2}$$

Em que N representa o número de padrões usados na curva de calibração. Compara-se este valor com o valor tabelado para n-1 graus de liberdade, sendo n o número de padrões utilizados. Se F_{exp} for menor ou igual a F_{crit} , as diferenças de variância não são significativas e a regressão linear é a mais adequada. Se F_{exp} for maior que F_{crit} , então a regressão não linear é a mais adequada.

6.1.3. Faixa linear de trabalho/ intervalo de linearidade

Para qualquer método quantitativo, existe uma faixa de concentrações do analito ou valores da propriedade no qual o método pode ser aplicado [51]. A faixa linear de trabalho deve englobar a faixa de concentração esperada para as amostras a analisar. A concentração esperada da amostra deve, sempre que possível, situar-se no centro da faixa de trabalho [51].

De modo a verificar se a gama de trabalho é adequada, usa-se o teste de homogeneidade de variâncias, de acordo com a ISO 8466-1 [53]. Para efetuar este teste, realizam-se geralmente 10 ensaios para o primeiro e último padrão da curva de calibração. Recorrendo ao teste F de Fisher, verifica-se se a gama de trabalho está bem ajustada ou se deve ser reduzida.

6.1.4. Sensibilidade

A sensibilidade é a capacidade na qual o método analítico consegue quantificar o analito de interesse na presença de interferentes. De uma maneira geral, a sensibilidade tem de ser capaz de ignorar quaisquer tipos de interferências e é definida pela capacidade de conseguir distinguir entre pequenas diferenças de concentração, com um determinado nível de confiança [49].

A sensibilidade da técnica analítica pode ser obtida a partir do valor da inclinação da curva analítica. O método é mais sensível quando pequenas variações de concentração resultam em maior variação na resposta, ou seja, maior inclinação [51].

6.1.5. Precisão

Todas as medições têm associados um determinado erro e fazer a estimativa desse erro é algo necessário na validação de resultados. Não é possível eliminar esse erro por completo, mas é possível estimar a sua magnitude e natureza, e, em certos casos, é possível reduzi-lo. Se uma mesma experiência for repetida uma série de vezes, os valores individuais obtidos vão se situar em torno de um valor médio [49]. A precisão é a estimativa da dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra ou padrões, em condições pré-definidas, e é afetada pelos erros aleatórios [49]. A precisão pode ser expressa através de estimativas do desvio padrão ou do desvio padrão relativo.

É importante que o valor obtido de precisão seja representativo das variações nas condições de ensaio, como mudança de analista, mudança de lotes de reagentes e mudança dos instrumentos de trabalho. Uma forma de melhorar a precisão numa análise é aumentar o número de réplicas de uma mesma amostra.

A definição de precisão de acordo com a norma ISO 3534 é: "Concordância entre os resultados obtidos por aplicação do mesmo procedimento de ensaio várias vezes em materiais idênticos, em condições definidas" [48]. A precisão pode ser avaliada de três formas diferentes, através da repetibilidade, da precisão intermédia e da reprodutibilidade [48].

6.1.5.1. Repetibilidade

A repetibilidade representa a concordância entre os resultados obtidos de medições sucessivas de um analito, sob as mesmas condições experimentais, mesmo método, mesmo equipamento, mesmo procedimento e mesmo analista, dentro de um curto intervalo de tempo. De uma maneira geral, a repetibilidade pode ser expressa através do desvio padrão relativo. A repetibilidade está associada a erros furtivos.

6.1.5.2. Precisão intermédia

A precisão intermédia é semelhante à repetibilidade, mas esta representa a concordância entre os resultados obtidos de medições efetuadas em diferentes

condições experimentais, mesmo método, mas por exemplo, equipamento ou analista diferente. De uma maneira geral, a precisão intermédia é obtida em condições intermédias entre a repetibilidade e reprodutibilidade [48].

De modo a obter a precisão intermédia, são efetuadas geralmente 10 medições de padrões de diferentes gamas ou brancos, em diferentes condições experimentais (num período de tempo alargado).

6.1.5.3. Reprodutibilidade

A reprodutibilidade de um método analítico é obtida pelo grau de concordância entre os resultados obtidos nas medições de uma mesma amostra efetuadas em diferentes condições, mudança de operador, laboratório, equipamentos, entre outros.

A principal diferença entre reprodutibilidade e precisão intermédia, é que nesta, além de variarem as condições experimentais, varia o laboratório onde as análises são realizadas. A reprodutibilidade é o resultado obtido de estudos de colaboração entre laboratórios, isto é, laboratórios diferentes, com condições de trabalho diferentes, analistas, equipamentos, analisam a mesma amostra e comparam os resultados obtidos. Este tipo de estudo tem como objetivo comparar os resultados de diferentes laboratórios e de uma maneira geral, de avaliar os próprios laboratórios.

6.1.6. Exatidão

A exatidão define-se como o grau de concordância entre o valor médio obtido de uma série de análises e o valor de referência aceite, que é um material de referência certificado. Esse material de referência certificado vem sempre acompanhado com o valor da concentração e a incerteza associada, que devem ser comparados com o valor obtido pelo laboratório [50]. A exatidão está associada a erros sistemáticos, também denominados de tendência. Geralmente, em laboratórios acreditados, são efetuados ensaios interlaboratoriais de modo a analisar a exatidão dos métodos. Nesta análise, é determinado o Z-score.

$$\text{Z-score} = \frac{X_{\text{lab}} - X_y}{S}$$

Em que:

X_{lab} – valor obtido pelo laboratório

X_y – valor de referência (valor verdadeiro)

S – desvio padrão

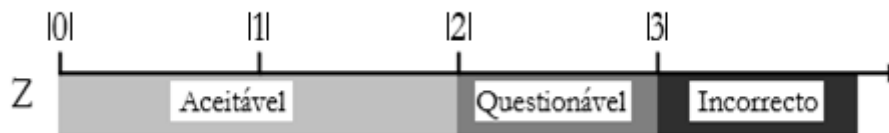


Figura 14: Avaliação do desempenho com z-scores, adaptado de [48]

Pela análise da figura 14, quando o valor de Z-score se encontra entre -3 e +3, então os resultados são satisfatórios, embora o resultado seja questionável acima de |2|. Idealmente, um laboratório deveria obter valores de Z-scores entre -2 a +2, mas na prática isto não acontece, neste caso deve-se elaborar um plano de ações corretivas de modo a procurar as causas que expliquem o sucedido de modo a poder corrigi-las e se possível, repetir a análise de forma a confirmar se o problema foi realmente corrigido [48]. Este valor permite também ao analista, verificar se o seu desempenho está dentro dos critérios pré-definidos para o método a analisar, permite detetar erros anormais e ter confiança nos resultados analíticos [54].

6.1.7. Limite de deteção / Limite de quantificação

O limite de deteção caracteriza-se por ser a concentração mais baixa de analito numa amostra que pode ser distinguida de zero, mas não necessariamente quantificável [49]. Normalmente é calculado como sendo três vezes a razão sinal/ruído do equipamento.

O limite de quantificação caracteriza-se por ser a concentração mais baixa de analito que é possível quantificar [49]. Este limite pode ser calculado de diversas formas, dependendo dos autores. Se estivermos a usar uma regressão linear e os valores de desvio padrão e do desvio padrão expandido estiverem abaixo dos 10%, o limite de quantificação é o valor da concentração do padrão mais baixo da reta de calibração, se os valores forem superiores a 10%, então este limite é calculado sendo dez vezes a razão sinal/ruído do equipamento.

7. Controlo de qualidade

O desempenho de um método validado deve ser verificado regularmente, de modo a certificarmos que o método está a desempenhar as funções como devia. Esta

verificação muitas vezes é obtida através do controlo de qualidade [55]. O laboratório deve fazer um controlo de modo a verificar a veracidade dos testes e calibrações efetuados. Este controlo deve ser registado e monitorizado de modo a ser fácil detetar tendências de um método e, se possível, corrigi-las de imediato [55].

No controlo de qualidade é recomendável a análise de amostras de controlo sempre que se analisem amostras. Geralmente é recomendável que 5% de todas as amostras analisadas pelo laboratório sejam amostras de controlo [56]. O controlo de qualidade é uma ferramenta importante em qualquer laboratório para manter a qualidade de um método e, se, um laboratório não fizer o devido controlo de qualidade dos resultados, não há nenhuma forma de assegurar a veracidade desses mesmos resultados.

As amostras de controlo devem ser materiais de referência certificados contendo o analito de interesse, outras amostras de controlo são os duplicados e as amostras fortificadas [56]. Os procedimentos de controlo de qualidade devem estar formalizados e bem descritos, tanto a frequência das análises, como os valores esperados.

7.1. Cartas de controlo

Em 1924, Walter Shewhart propôs um gráfico de controlo como meio de aplicar a estatística como forma de controlar o processo. A forma de carta de controlo mais simples é onde os resultados de medições individuais estão representados como função do tempo [57]. As cartas de controlo são usadas para monitorizar a variabilidade de um sistema em forma de gráfico, para ser mais fácil de analisar. Um padrão de referência, de concentração conhecida, é analisado em determinados intervalos, definidos pelo analista, de forma a obter-se um gráfico com os valores obtidos após análise desse padrão [49].

No exemplo de uma carta de controlo representada na figura 15, pode-se observar que as medições estão representadas em função do tempo. A linha central da carta é o valor médio ou o valor esperado, as linhas mais próximas da linha central são os limites de aviso e geralmente são $\bar{X} \pm 2\sigma/\sqrt{n}$, em que os valores obtidos das medições dos padrões devem-se situar. As linhas mais afastadas da linha central são os limites de controlo e geralmente são $\bar{X} \pm 3\sigma/\sqrt{n}$, em que \bar{X} é o valor médio, σ o desvio padrão e n o número de amostras para obter a média [58].

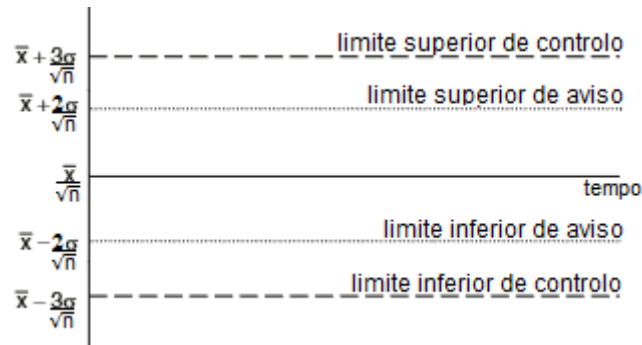


Figura 15: Limites de uma carta de controlo, adaptado de [58]

As cartas de controlo são usadas em diversas aplicações, não só em medições analíticas, o que demonstra a versatilidade destas cartas. Na elaboração destas cartas de controlo, podem ser usados uma grande variedade de materiais, podendo ser padrões certificados, materiais de referência certificados, materiais de referência internos e até duplicados de uma mesma amostra [58]. As cartas de controlo permitem detetar possíveis situações anormais que possam ocorrer durante a execução dos métodos de ensaio. Estas cartas são de extrema utilidade se forem elaboradas com um objetivo concreto [58]. Existem vários tipos de cartas de controlo. Em seguida está uma breve apresentação de três tipos de cartas: a carta de controlo de médias Shewart, a carta cumulativa e a carta de controlo de zona, em que a mais usada ainda é a carta de controlo de Shewart.

7.1.1. Cartas de controlo de médias (Shewart)

Este tipo de carta de controlo é a mais usual, devido à sua simplicidade de construção. Esta carta faz a representação ao longo do tempo do parâmetro desejado, concentração, por exemplo, e contém 5 linhas de apoio, a linha central, que geralmente é a média ou o valor esperado, duas linhas de aviso e duas linhas de controlo, como se pode verificar na figura 16 [58].

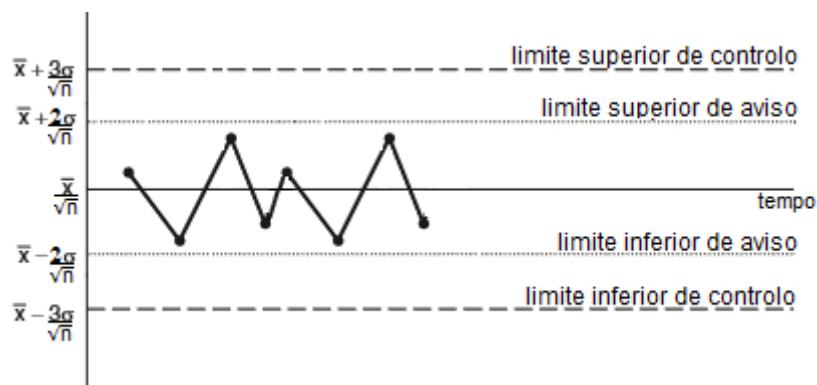


Figura 16: Carta de controlo de Shewart, adaptado de [59]

Segundo a RELACRE - Associação de Laboratórios Acreditados de Portugal, se um ponto exceder os limites de controlo, a análise deve ser repetida, se após essa repetição o novo ponto se situar dentro dos limites, continuar e aceitar os resultados, mas se se situar novamente fora dos limites de controlo, interromper as análises e corrigir o problema [58].

Se dois ou três pontos consecutivos excederem os limites de aviso, deve ser analisado um novo ponto e se esse ponto se encontrar dentro dos limites de aviso, continuar e aceitar os resultados das análises, mas se se situar fora dos limites de aviso, interromper e corrigir o problema.

Se 6 pontos consecutivos se localizarem todos acima ou todos abaixo da linha central, deve-se ter atenção à localização do ponto seguinte, se esse ponto se localizar no outro lado da linha central, aceitam-se os resultados, se se localizar do mesmo lado da linha central, interromper e corrigir o problema.

Uma das grandes desvantagens da carta de controlo de Shewhart é o facto de poder detetar alterações do sistema várias dezenas de amostras após essa alteração ter ocorrido [60]. Surgem então as cartas de controlo cumulativas, também designadas de CUSUM.

7.1.2. Cartas de controlo cumulativas (CUSUM)

As cartas de controlo cumulativas são bastante diferentes visualmente das cartas de controlo de Shewart. Este tipo de carta de controlo não possui os limites da anterior e não usa o valor das medições na construção do gráfico. Em relação ao controlo do sistema, as cartas CUSUM mostram que o sistema pode estar fora do controlo mais rapidamente [55].

Na figura 17, está apresentado um exemplo de uma carta CUSUM. Na representação gráfica deste tipo de carta de controlo, nos eixos dos xx estão apresentados os números de observação e nos eixos dos yy a soma cumulativa das diferenças algébricas entre a amostra e o valor alvo [60]. Na tabela 1 estão os valores usados na elaboração desta carta de controlo. É necessário saber o valor alvo ou valor desejado, para ser subtraído ao valor obtido da média da amostra, e estas diferenças vão sendo somadas. No exemplo apresentado, o valor alvo é de 80.

Tabela 1: Dados para a construção da carta de controlo CUSUM

Número de observação	Média da amostra	Média da amostra – Valor alvo	CUSUM
1	80	0	0
2	80	0	0
3	79	-1	-1
4	78	-2	-3
5	80	0	-3
6	76	-4	-7
7	77	-3	-10
8	76	-4	-14
9	76	-4	-18
10	75	-5	-23

Os valores da tabela 1 estão representados na figura 17, sob a forma de carta de controlo.

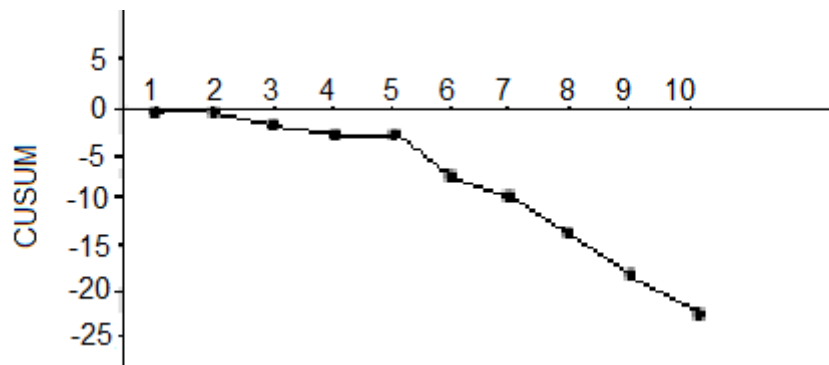


Figura 17: Carta de controlo CUSUM, adaptado de [59]

Para fazer o controlo neste tipo de carta, existem dois métodos usados, um sendo a utilização de máscaras em V, como apresentado na figura 18, ou estabelecendo limites admissíveis à soma cumulativa, representado na figura 19.

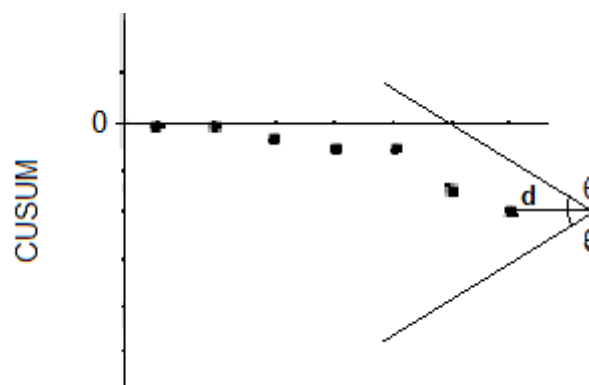


Figura 18: Carta de controlo CUSUM com o uso de máscara em V, adaptado de [48]

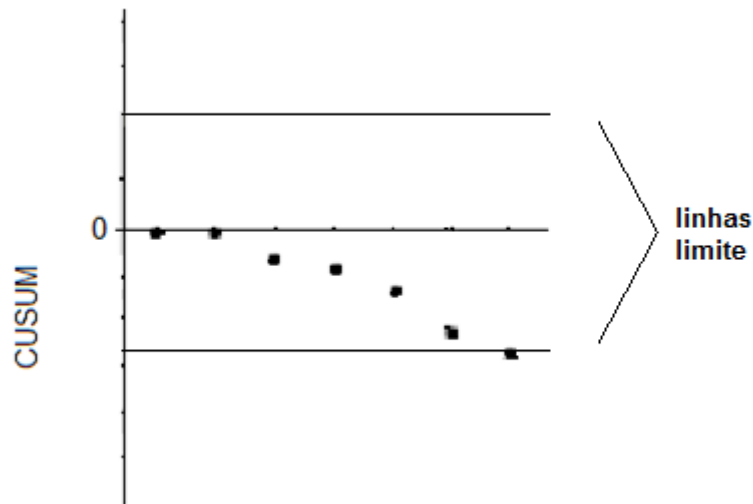


Figura 19: Carta de controlo CUSUM com o uso de linhas limite, adaptado de [48]

Relativamente à máscara em "V", o comprimento do segmento horizontal geralmente corresponde à distância de 2 pontos na carta, e o cone tem um ângulo de abertura (total) de 60° ($30^\circ + 30^\circ$) [48]. No segundo método, do uso de linhas limite, o analista estipula os valores dos limites de acordo com o objetivo pretendido. Este método é mais simples de usar que as máscaras [48].

Em ambos os métodos, a deteção do sistema fora do controlo é fácil de interpretar. No caso da máscara em V, se todos os pontos se situarem dentro da máscara, então o sistema está sob controlo, no segundo método, se os pontos excederem o limite estabelecido, então o sistema encontra-se fora do controlo [60].

7.1.3. Cartas de controlo de Zona

Por último, a carta de controlo de zona, que combina características das duas cartas de controlo anteriores. Visualmente este tipo de carta de controlo é muito idêntica à carta de controlo de Shewart, pois possui os mesmos limites desta carta, os limites de controlo e os limites de aviso. Esta carta de controlo tem outro limite em $\bar{X} \pm \bar{\sigma}$.

A principal característica desta carta de controlo é que aos valores das médias são atribuídas pontuações dependendo da zona em que se encontram. As pontuações dadas em cada limite estão indicadas na figura 20. As pontuações de cada ponto vão sendo acumuladas até surgir um ponto no lado oposto da linha central, que faz com que o valor acumulado fique zero.

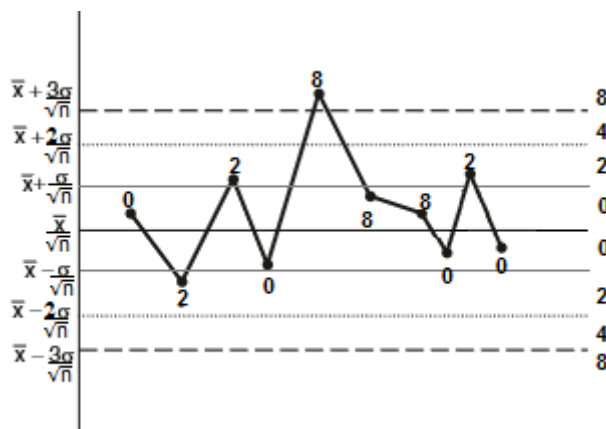


Figura 20: Exemplo de Carta de Controlo de Zona, adaptado de [59]

Na carta de controlo de zona, o sistema pode estar a ficar fora de controlo se a pontuação for igual ou superior a 8.

8. Objetivos do estágio

O objetivo principal deste trabalho consistiu pois na validação de 3 métodos para a determinação dos iões nitrato, nitrito e amónio, bem como implementar o seu controlo de qualidade numa utilização em rotina.

Um outro objetivo prendeu-se com a execução regular da determinação de diversos parâmetros em águas naturais, tais como pH, condutividade e oxidabilidade, já validados e utilizados rotineiramente no laboratório. Toda a informação relacionada com os métodos e o volume de trabalho executado neste último caso está disponível no anexo I.

9.Procedimentos

Neste capítulo estão apresentados os procedimentos usados para a determinação de anião nitrato, anião nitrito e catião amónio. Como estes três métodos são de execução bastante semelhante, por serem determinados no mesmo equipamento, serão enumerados em seguida os aspetos em comum.

Uma solução usada nos três métodos é a solução de Brij 35 (0,030% m/V). O Brij 35 consiste num tensioativo não iónico do tipo polioxietileno, que serve como detergente para várias aplicações.

Preparou-se inicialmente o Brij 35 (30%), dissolvendo 30,0g de Brij 35 (Fluka, p.a) em aproximadamente 70mL de água destilada. Aqueceu-se a mistura de modo a facilitar a dissolução do Brij 35 e quando a mistura atingiu a temperatura ambiente, transferiu-se para um balão de 100mL e preencheu-se com água destilada.

Na preparação da solução de Brij 35 (0,030%), dilui-se 1mL de Brij 35 (30%), preparado inicialmente, em 1000mL de água destilada e homogeneizou-se a solução.

O equipamento utilizado em todos os métodos foi um autoanalisador de fluxo segmentado SKALAR, modelo SAN PLUS SYSTEM, com fotómetro de matriz. Este foi operado da maneira genérica descrita em seguida.

Ligou-se o autoanalisador de modo a estabilizar a temperatura durante cerca de 30min; anexaram-se os reagentes nos sítios correspondentes, verificando que nenhum tubo se encontrava entupido e colocaram-se, tanto as soluções padrão como as amostras, em tubos de plástico, na respetiva secção do autoanalisador. Ligou-se o programa SKALAR no computador anexado ao autoanalisador e fez-se uma descrição das amostras a analisar. Quando se verificou que o fluxo dos reagentes estava constante, usou-se o programa SKALAR para começar a análise. Quando terminada a análise, removeram-se todos os reagentes e colocou-se água destilada para fazer lavagem ao autoanalisador, durante cerca de 30min. No final da lavagem, desligou-se o autoanalisador.

O material de laboratório de uso corrente usado nos três métodos consistiu em tubos de ensaio 10 x 15 mm em plástico, balões volumétricos, pipetas volumétricas e micropipetas de várias capacidades.

9.1. Determinação do anião nitrato

9.1.1. Preparação de soluções

As soluções necessárias para a determinação do anião nitrato são: solução de Brij 35 (0,030%), solução tampão e reagente corante. Estas soluções são estáveis, sendo preservadas no frigorífico até à sua utilização. O modo de preparação das duas últimas está descrito de seguida.

Na preparação da solução tampão, dissolveu-se 80g de cloreto de amónio (NH_4Cl , Panreac) em cerca de 800mL de água destilada num balão de 1000mL. Adicionou-se à mistura cerca de 1mL de solução de amoníaco (NH_4OH 25%, Fluka, p.a) de modo a ajustar o pH a 8,2. Adicionou-se 1mL de sulfato de cobre (20mg/L) e 1mL de brij 35 (30%) e perfez-se o volume da solução.

Para preparar o reagente corante, diluiu-se 150mL de ácido o-fosfórico (H_3PO_4 85%, Panreac, p.a) em cerca de 800mL de água destilada, num balão de 1000mL. Adicionou-se 10g de sulfanilamida ($\text{C}_6\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$, Panreac, p.a, 98%) e 0,5g de N-(1-naftil)-etilenodiamida dihidroclórica ($\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{Cl}_2\text{N}_2$, Panreac, p.a, 98%). Perfez-se o volume do balão.

9.1.2. Soluções padrão

Inicialmente preparou-se uma solução de concentração 10.000 mg/L de anião nitrato, dissolvendo-se 13,708g de nitrato de sódio (NaNO_3 , Merck, p.a, 99,5%) em água destilada num balão de 1000mL. As soluções padrão de anião nitrato foram preparadas a partir desta solução de acordo com a tabela 2.

NOTA: As soluções padrão de anião nitrato são estáveis e apenas são feitas quando necessário.

Tabela 2: Preparação dos padrões de anião nitrato

$[\text{NO}_3^-] / \text{mgL}^{-1}$	V_i / mL	V_f / mL	$[\text{NO}_3^-]_d / \text{mgL}^{-1}$
10.000	0,100	500,0	2,00
	0,300		6,00
	0,400		8,00
	0,500		10,0

9.1.3. Procedimento experimental

Como se trata de um analito inorgânico, não é recomendável fazer descontaminações regulares, apenas quando se está na presença de contaminações no método ou presença de bactérias. A lavagem com água no final de cada análise é suficiente. O esquema de funcionamento deste método de fluxo segmentado encontra-se ilustrado na figura 21.

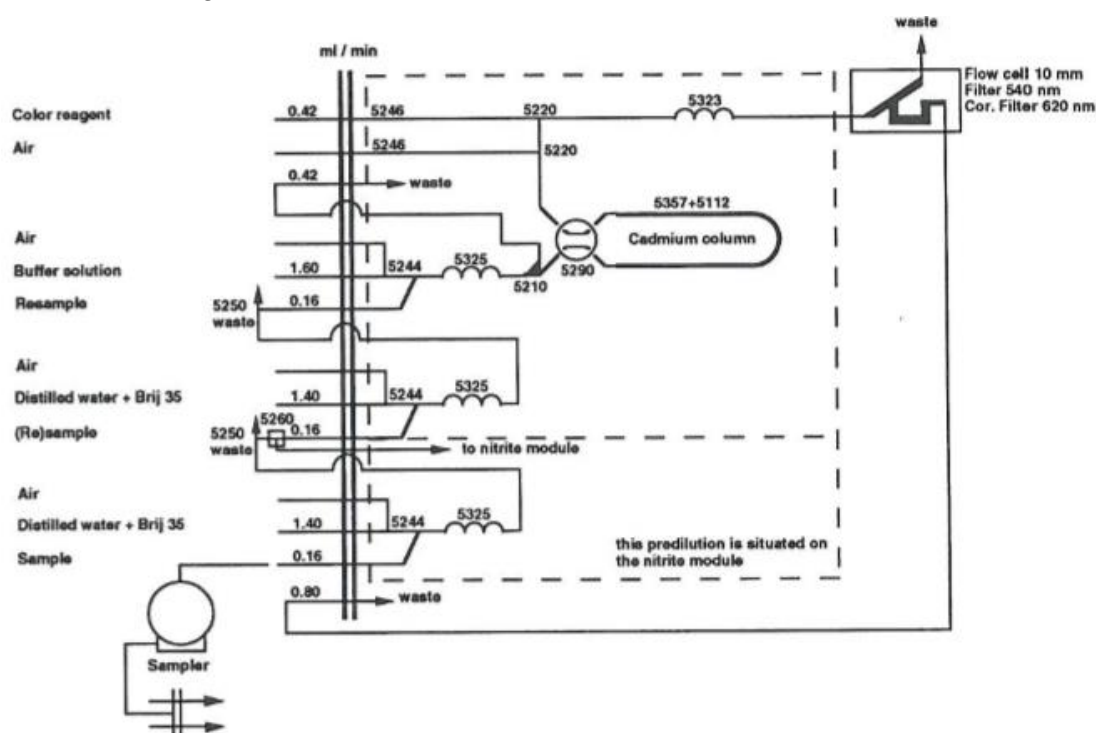


Figura 21: Esquema de funcionamento do método de determinação de anião nitrato

9.2. Determinação do anião nitrito

9.2.1. Preparação de soluções

Na determinação do anião nitrito, para além da solução Brij 35 (0,030%) é utilizada outra de reagente corante. Estas soluções são estáveis e são preservadas no frigorífico até à sua utilização. O modo de preparação está descrito de seguida.

Para preparar o reagente corante, diluiu-se 150mL de ácido o-fosfórico (H_3PO_4 85%, Panreac, p.a) em cerca de 800mL de água destilada num balão de 1000mL. Adicionou-se posteriormente 10g de sulfanilamida ($C_6H_8N_2O_2S$, Panreac, p.a, 98%) e 0,5g de N-(1-naftil)-etilenodiamida dihidroclórica ($C_{12}H_{16}Cl_2N_2$, Panreac, p.a, 98%) Perfez-se o volume do balão.

9.2.2. Soluções padrão

Inicialmente preparou-se uma solução de concentração 100 mg/L de anião nitrito, dissolvendo-se 0,1499g de nitrito de sódio ($NaNO_2$, Merck, p.a, 99%) em água

destilada num balão de 1000mL. Para a preparação das soluções padrão da curva de calibração, foi necessário fazer uma diluição da solução inicial, de modo a ficar com uma concentração de 10mg/L. Para isto, dilui-se 10mL da solução de 100mg/L em 100mL de água destilada. As soluções padrão de anião nitrito foram preparadas a partir da solução de 10mg/L, de acordo com a tabela 3.

NOTA: Apenas a solução de 100mg/L é estável, todas as diluições feitas a partir desta solução, têm de ser preparadas no dia da análise.

Tabela 3: Preparação dos padrões de anião nitrito

$[\text{NO}_2^-] / \text{mgL}^{-1}$	V_i / mL	V_f / mL	$[\text{NO}_2^-]_d / \mu\text{gL}^{-1}$
10,00	0,100	100,0	10,0
	0,150		15,0
	0,200		20,0
	0,300		30,0

9.2.3. Procedimento experimental

Como se trata da determinação do anião nitrito, é necessário fazer descontaminações sempre que se verificar instabilidade no método. A descontaminação consiste em colocar NaOH 0,5 mol/L nos locais dos reagentes e deixar passar durante 30min, passado este tempo, troca-se a solução por água destilada e deixa-se limpar durante mais 30min.

O esquema de funcionamento em fluxo deste método encontra-se representado na figura 22.

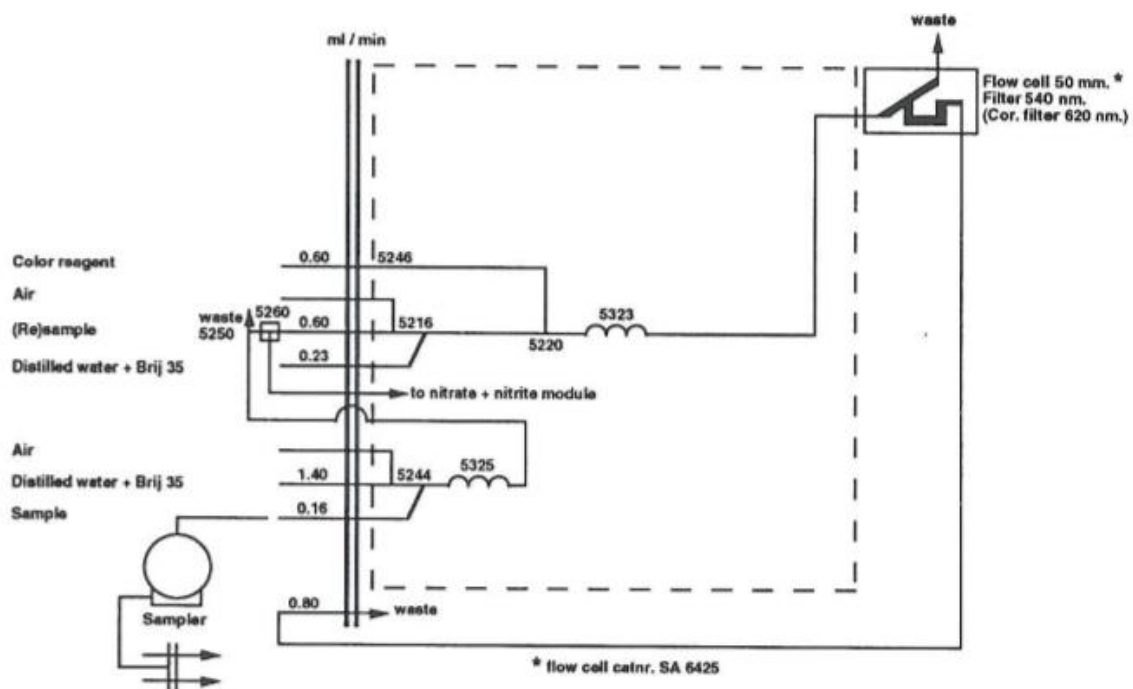


Figura 22: Esquema de funcionamento do método de determinação de anião nitrito

9.3. Determinação do catião amónio

9.3.1. Preparação de soluções

As soluções necessárias para a determinação do catião amónio são: Brij 35 (0,030%), solução tampão, solução de salicilato de sódio, solução de nitroprussiato de sódio e solução de dicloroisocanurato de sódio. Apenas a solução de Brij 35 (30%) e a solução tampão são estáveis, as restantes soluções apenas são estáveis durante uma semana, sendo preparadas todas as semanas e armazenadas no frigorífico até à sua utilização. O modo de preparação destas soluções (exceto de Brij35) está descrito de seguida.

Na preparação da solução tampão, dissolveu-se 33g de tartarato de sódio e potássio ($C_4H_4O_6KNa \cdot 4H_2O$, Panreac, p.a, 99%) em cerca de 800mL de água destilada, num balão de 1000mL. Adicionou-se 24g de citrato de sódio ($C_6H_5O_7Na_3 \cdot 2H_2O$, Panreac, p.a, 99%) até ser dissolvido. Encheu-se quase até ao topo o balão volumétrico e adicionou-se 1mL de Brij 35 (30%). Perfez-se o volume do balão com água destilada.

Para preparar a solução de salicilato de sódio dissolveu-se 25g de hidróxido de sódio (NaOH, Riedel-de Haën, p.a, 99,5%) em cerca de 50mL de água destilada, num balão de 1000mL. Adicionou-se água até cerca dos 500mL e dissolveu-se 80g de salicilato de sódio ($C_7H_5NaO_3$, Riedel-de Haën, p.a, 98%). Perfez-se então o volume do balão volumétrico.

A solução de nitroprussiato de sódio foi preparada dissolvendo 1g de nitroprussiato de sódio ($Na_2[Fe(CN)_5NO] \cdot 2H_2O$, Fluka, p.a, 98%) em cerca de 800mL de água, num balão de 1000mL. Perfez-se o volume do balão.

A solução de dicloroisocanurato de sódio foi preparada dissolvendo 2g de dicloroisocianurato de sódio ($C_3N_3O_3Cl_2Na \cdot 2H_2O$, Aldrich, p.a, 98%) em cerca de 800mL de água destilada, num balão de 1000mL. Perfez-se o volume da solução.

9.3.2. Soluções padrão

Inicialmente preparou-se uma solução de concentração de 100 mg/L de catião amónio, dissolvendo 0,2965g de cloreto de amónio (Panreac, p.a, 99,5%) em água destilada num balão de 1000mL. Para a preparação das soluções padrão da curva de calibração, fez-se uma diluição da solução anterior, de modo a ficar com uma concentração de 10mg/L. Diluiu-se 10mL da solução de 100mg/L em 100mL de água destilada.

NOTA: Apenas a solução de 100mg/L é estável, todas as diluições feitas desta solução, têm de ser preparadas no dia da análise.

$[\text{NH}_4^+] / \text{mg/L}$	V_i / mL	V_f / mL	$[\text{NH}_4^+]_d / \mu\text{g/L}^{-1}$
10,00	0,300	100,0	30,0
	0,600		60,0
	0,800		80,0
	1,00		100,0

As amostras devem ser analisadas após colheita ou até no máximo 24h depois. Como se trata do catião amônio, é recomendável fazer descontaminações regulares e ter muito cuidado durante a análise. Para descontaminar o autoanalisador, deve-se passar nos locais dos reagentes, uma solução a 10% de hipoclorito de sódio durante cerca de 30min, e em seguida, passar com água destilada durante 30min. Durante a análise das amostras, tem de haver o cuidado de manter a sala onde se encontra o aparelho, bem fechada para não haver contaminações.

The diagram illustrates a flow injection analysis (FIA) system for the determination of nitrite in water. The system consists of a central vertical tube with various reagents and samples being introduced at different points. The flow rates are indicated in ml/min. The system includes a sampler, a flow cell, a filter, and a waste outlet.

Reagents and Flow Rates:

- Sodium dichloroisocyanurate: 0.32 ml/min
- Sodium nitroprusside: 0.16 ml/min
- Sodium salicylate: 0.32 ml/min
- Air**
- (Re)sample: 1.40 ml/min
- Buffer solution: 0.32 ml/min
- Air
- Distilled water + Brij 35: 2.00 ml/min
- Sample: 0.23 ml/min

Flow Cell and Filter:

- Flow cell 50 mm
- Filter 660 nm
- Cor. filter 1010 nm

Waste and Sampler:

- Waste outlet
- Sampler

Legend:

- * tube flow cell catnr. SA 6425
- ** nitrogen gas or air with wash bottle filled with 1N sulfuric acid

Figura 23: Esquema de funcionamento do método de determinação de catião amônio

10. Apresentação e discussão dos resultados

10.1. Validação dos métodos

Foi feita a validação dos métodos de análise de anião nitrato, anião nitrito e catião amónio usando o autoanalisador SKALAR, com software “Flow access”. Por questões práticas, este capítulo encontra-se dividido nos vários parâmetros de validação, sendo tratados os três métodos em simultâneo.

10.1.1. Seletividade

A seletividade dos métodos foi avaliada recorrendo à análise de 10 amostras. Na tabela 5 encontram-se os resultados para o método de determinação de anião nitrato, em que se encontram os valores das concentrações das amostras, das amostras fortificadas e dos respetivos padrões e o cálculo da % de recuperação.

Tabela 5: Resultados obtidos no estudo da sensibilidade do método de determinação de anião nitrato

Dia	[NO ₃ ⁻] / mgL ⁻¹			% Recuperação
	Amostra	Padrão 2mgL ⁻¹	Amostra Fortificada	
09-05-2014	2,99	1,90	5,04	108
09-05-2014	2,99	1,90	5,02	107
09-05-2014	5,05	1,90	7,22	114
09-05-2014	3,31	1,90	5,46	113
09-05-2014	4,63	1,90	6,55	101
15-05-2014	4,10	1,90	6,17	109
15-05-2014	3,38	1,90	5,45	109
15-05-2014	3,37	1,90	5,36	105
15-05-2014	4,42	1,90	6,30	99
15-05-2014	3,60	1,90	5,40	95

O valor da concentração do padrão escolhido para o estudo da sensibilidade foi o de 2mg/L. Pela análise dos resultados podemos verificar que todos os valores de % de recuperação obtidos encontram-se dentro do intervalo de 80-120%. Este facto permite afirmar que o método é seletivo.

Para o caso do método de determinação de anião nitrito, o padrão utilizado foi o de 10µg/L. Analisando a tabela 6, podemos afirmar que os valores de % de recuperação encontram-se no intervalo desejado, logo podemos afirmar que o método é seletivo.

Tabela 6: Resultados obtidos no estudo da sensibilidade do método de determinação de anião nitrito

Dia	$[\text{NO}_2^-] / \mu\text{gL}^{-1}$			% Recuperação
	Amostra	Padrão $10\mu\text{gL}^{-1}$	Amostra Fortificada	
09-05-2014	15,54	9,67	26,36	112
09-05-2014	18,24	9,67	27,31	94
09-05-2014	13,66	9,67	22,6	92
09-05-2014	31,32	9,67	41,88	109
09-04-2014	14,79	10,15	24,76	98
16-04-2014	11,24	9,89	21,10	100
15-05-2014	12,36	9,79	22,34	102
15-05-2014	16,29	9,79	25,81	97
15-05-2014	12,51	9,79	20,83	85
15-05-2014	9,66	9,79	19,14	97

Por fim, para o método de determinação de catião amónio, o padrão escolhido para a amostra fortificada foi o de $30\mu\text{gL}^{-1}$. Pela análise da tabela 7, como todos os valores obtidos de % de recuperação se encontram dentro do limite desejado, o método é seletivo.

Tabela 7: Resultados obtidos no estudo da sensibilidade do método de determinação de catião amónio

Dia	$[\text{NH}_4^+] / \mu\text{gL}^{-1}$			% Recuperação
	Amostra	Padrão	Amostra Fortificada	
06/05/2014	58,66	31,86	91,05	102
06/05/2014	60,54	33,80	100,09	117
06/05/2014	74,09	30,79	106,02	104
12/06/2014	73,08	30,89	106,02	107
17/06/2014	70,19	33,27	101,27	93
17/06/2014	43,11	32,21	71,11	87
17/06/2014	30,34	32,21	60,11	92
17/06/2014	30,53	32,21	57,44	84
17/06/2014	46,25	32,21	79,93	105
17/06/2014	27,06	32,21	58,61	98

De uma maneira geral, o intervalo de valores de percentagem de recuperação observado dos três métodos em estudo mantiveram-se entre os 80-120%, por isso os métodos são seletivos.

10.1.2. Linearidade

A linearidade dos três métodos foi avaliada através de uma curva de calibração constituída por 5 soluções padrão de concentração bem conhecida. Estes padrões foram analisados nas mesmas condições em que as amostras são analisadas. A

linearidade do método foi avaliada com base nas normas ISO 8466-1 e 8466-2, e para tal, realizaram-se 10 ensaios de curvas de calibração, apresentando-se nas tabelas 8, 10 e 12 os resultados obtidos [53, 61].

Relativamente ao método de determinação de anião nitrato, a curva de calibração foi construída usando soluções padrão de concentração 0, 2, 6, 8 e 10 mgL⁻¹, apresentados na tabela 8. Nas figuras 24 e 25 estão representados graficamente os resultados para o ajuste linear e para o ajuste não linear deste método.

Tabela 8: Resultados obtidos para o estudo de linearidade do método de determinação de anião nitrato

Padrão [NO ₃ ⁻] / mgL ⁻¹	P1	P2	P3	P4	P5
	0,0	2,0	6,0	8,0	10,0
Absorvância / mUA	509	1204	2640	3231	3883
	554	1144	2481	3186	3923
	525	1212	2510	3184	3857
	533	1231	2539	3205	3908
	515	1220	2552	3215	3904
	521	1241	2570	3266	3963
	592	1146	2309	2913	3526
	562	1171	2354	2989	3724
	536	1116	2282	2719	3304
	559	1121	2285	2688	3171
Média	541	1181	2452	3060	3716

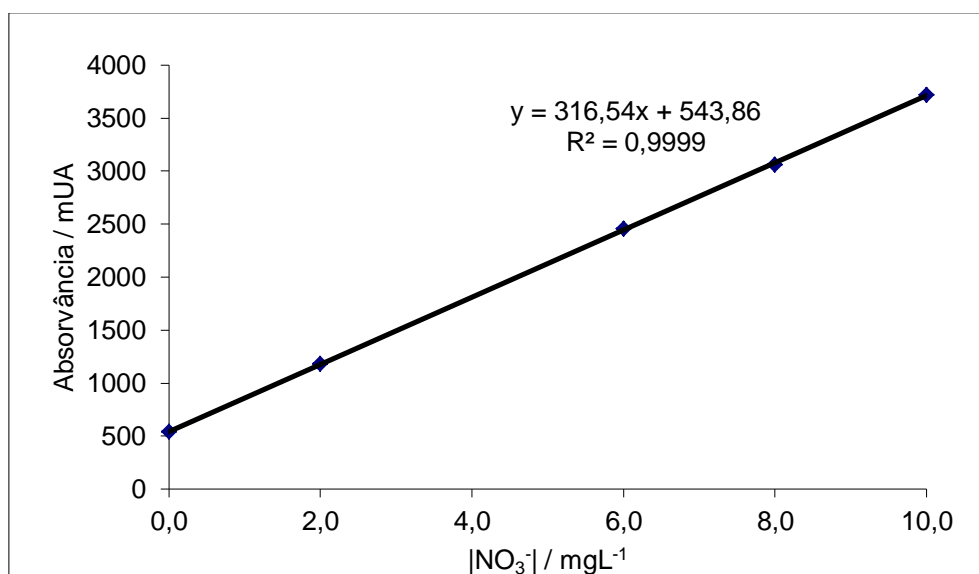


Figura 24: Ajuste linear do método de determinação de anião nitrato

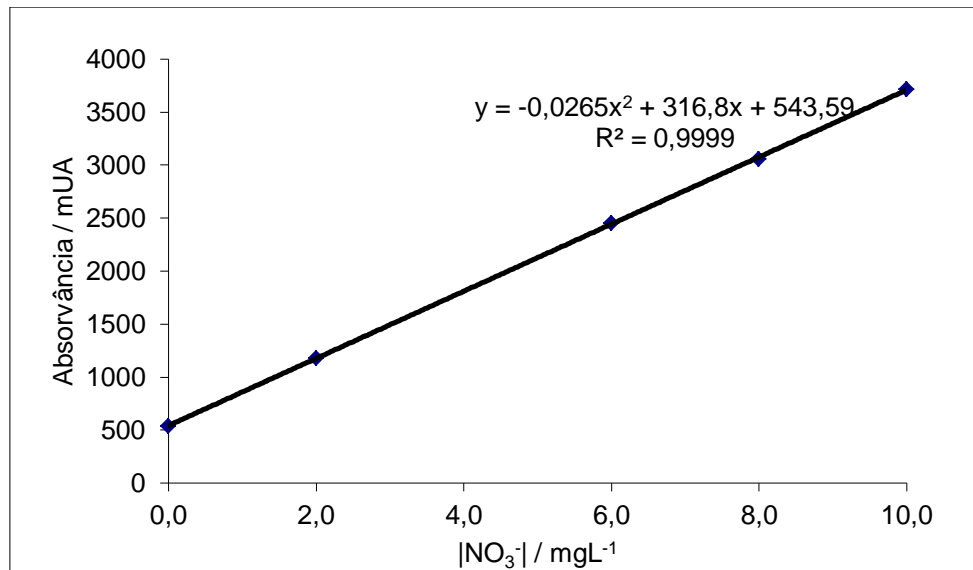


Figura 25: Ajuste não linear do método de determinação de anião nitrato

Tabela 9: Estudo de linearidade do método de determinação de anião nitrato

Linear		Não linear	
$S_{y/x}$	9,29	S_{y^2}	10,38
$S^2_{y/x}$	86,26	$S^2_{y^2}$	107,74
ΔS^2			
43,30			

$$F_{\text{exp}} = 0,40$$

$$F_{\text{crit}} (95\%) = 18,51$$

De acordo com os resultados apresentados na tabela 9, pelo teste de Fisher, obteve-se um valor de F_{exp} inferior a F_{crit} , o que indica que a regressão linear é adequada para este caso.

Em relação ao estudo de linearidade do método de determinação de anião nitrito, a curva de calibração foi construída usando soluções padrão de concentração 0, 10, 15, 20 e 30 µg/L. Os resultados obtidos estão apresentados na tabela 10 e os gráficos correspondentes ao ajuste linear e ao ajuste não linear encontram-se representados nas figuras 26 e 27.

Tabela 10: Resultados obtidos para o estudo de linearidade do método de determinação de anião nitrito

Padrão	P1	P2	P3	P4	P5
$[\text{NO}_2^-] / \mu\text{gL}^{-1}$	0,0	10,0	15,0	20,0	30,0
Absorvância / mUA	518	619	682	725	837
	514	611	664	718	820
	522	645	708	765	884
	551	657	711	763	873
	559	628	697	753	806
	534	659	717	771	889
	551	630	685	715	793
	519	635	694	758	868
	522	620	680	738	850
	515	623	679	738	861
Média	531	633	692	744	848

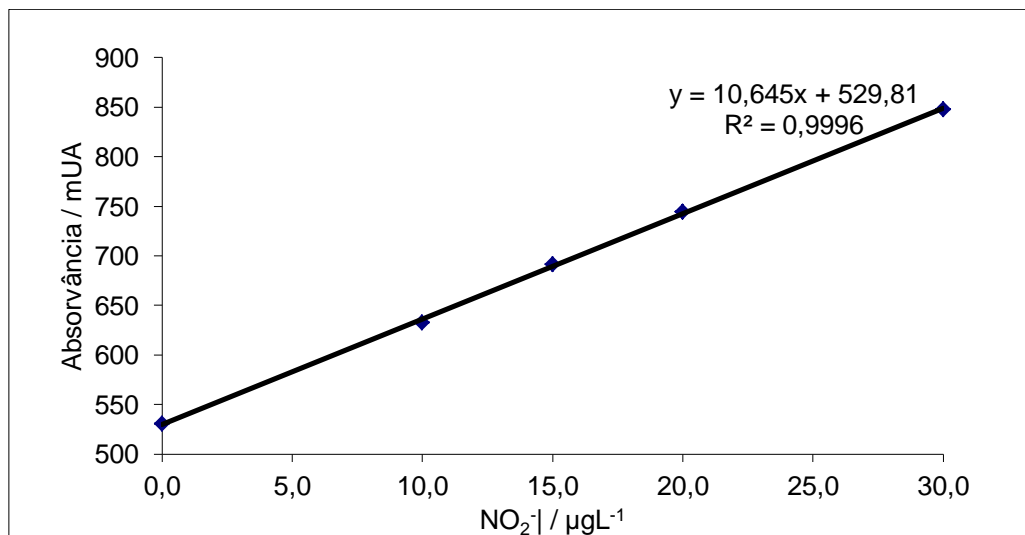


Figura 26: Ajuste linear do método de determinação de anião nitrito

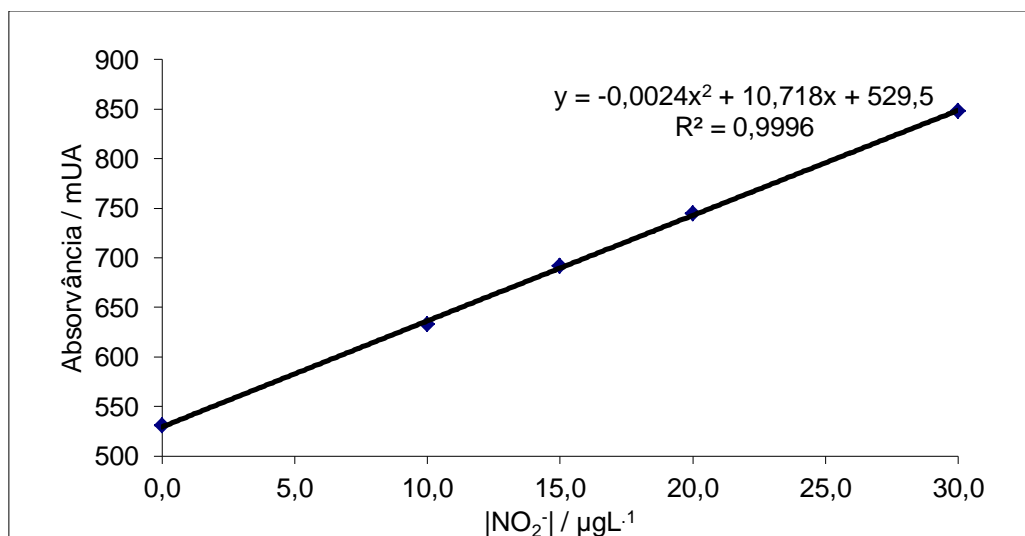


Figura 27: Ajuste não linear do método de determinação de anião nitrito

Tabela 11: Estudo de linearidade do método de determinação de anião nitrito

Linear		Não linear	
$S_{y/x}$	2,10	S_{y^2}	2,33
$S^2_{y/x}$	4,41	$S^2_{y^2}$	5,43
ΔS^2			
2,358			

$$F_{\text{exp}} = 0,43$$

$$F_{\text{crit}} (95\%) = 18,51$$

Analisando os resultados obtidos na tabela 11 e pelo teste F, obteve-se um valor de F_{exp} inferior a F_{crit} , que faz com que o ajuste linear seja o mais indicado para este caso.

Por fim, relativamente ao método de determinação de catião amónio, a curva de calibração foi elaborada usando as soluções padrão de concentração 0, 30, 60, 80 e 100 µg/L. Os resultados obtidos estão na tabela 12 e a representação gráfica dos dois ajustes encontram-se nas figuras 28 e 29.

Tabela 12: Resultados obtidos para o estudo de linearidade do método de determinação de catião amónio

Padrão	P1	P2	P3	P4	P5
$[\text{NH}_4^+] / \mu\text{gL}^{-1}$	0,0	30,0	60,0	80,0	100,0
Absorvância / mUA	526	594	701	740	806
	539	630	728	780	860
	559	628	697	753	806
	525	577	652	707	760
	548	610	685	742	791
	555	616	691	744	801
	551	623	721	776	830
	545	612	689	755	808
	551	632	703	777	840
	548	606	686	716	776
Média	545	613	695	749	808

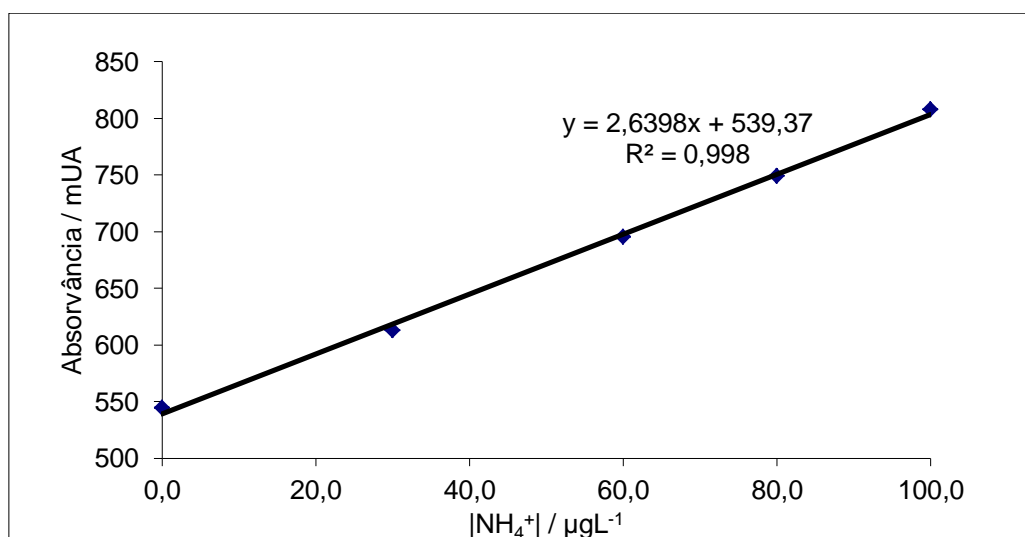


Figura 28: Ajuste linear do método de determinação de catião amónio

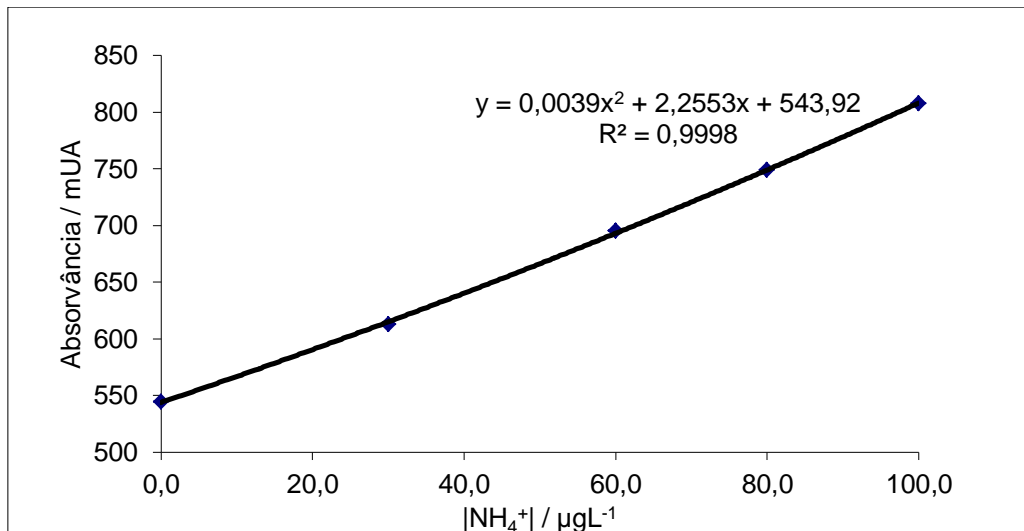


Figura 29: Ajuste não linear do método de determinação de catião amónio

Tabela 13: Estudo de linearidade do método de determinação de catião amónio

Linear		Não linear	
$S_{y/x}$	4,24	S_{y^2}	1,62
$S^2_{y/x}$	17,98	$S^2_{y^2}$	2,61
ΔS^2			
48,709			

$$F_{\text{exp}} = 18,64$$

$$F_{\text{crit}} (95\%) = 18,51$$

Analisando os resultados da tabela 13 e fazendo o teste F, podemos observar que se obteve um valor de F_{exp} ligeiramente superior a F_{crit} . Apesar de neste caso o ajuste linear não ser o mais adequado, como os valores de F não são muito diferentes entre si, e tendo em conta o valor de R^2 do ajuste linear, considerou-se aceitável o ajuste linear.

Pela análise dos resultados do estudo de linearidade dos três métodos, podemos afirmar que é adequado para todos o ajuste linear. O catião amónio obteve valores mais elevados de F_{exp} , mesmo assim aceitou-se este ajuste.

10.1.3. Faixa linear de trabalho/ intervalo de linearidade

A escolha da gama de trabalho é muito importante para que o analista possa saber qual o intervalo de concentrações a usar. Os padrões da curva de calibração devem abranger toda a gama de trabalho e esta deve estar devidamente definida e

validada, sendo que esta validação pode ser feita recorrendo ao teste da homogeneidade de variâncias. O teste de homogeneidade de variâncias foi realizado com base na ISO 8466-1, e para tal realizaram-se 10 ensaios para o primeiro e último padrão da curva de calibração dos três métodos em estudo, apresentando nas tabelas 14-19 os resultados obtidos [53].

Na tabela 14 estão apresentados os resultados do padrão mais diluído e do padrão mais concentrado do anião nitrato, 2mgL^{-1} e 10mgL^{-1} , respetivamente.

Tabela 14: Resultados obtidos para o cálculo da homogeneidade das variâncias dos padrões de anião nitrato

Padrão	2mgL^{-1}	10mgL^{-1}
Concentração/ mgL^{-1}	2,14	9,71
	2,10	9,77
	2,15	9,86
	2,15	9,84
	2,20	9,81
	2,15	9,81
	2,17	9,86
	2,17	9,79
	2,17	9,82
	2,15	9,87

Tabela 15: Cálculo da homogeneidade das variâncias dos padrões de anião nitrato

Padrão / mgL^{-1}	Desvio Padrão	Variância	F_{exp}	$F_{\text{crit}} (99\%)$
2,00	$2,59 \times 10^{-2}$	$6,72 \times 10^{-4}$	3,54	5,35
10,00	$4,89 \times 10^{-2}$	$2,38 \times 10^{-3}$		

De modo a verificar se existe diferença significativa entre as variâncias do padrão mais baixo e do padrão mais concentrado do anião nitrato, realizou-se o teste F com os valores da tabela 15. Como F_{exp} é inferior a F_{crit} , pode-se afirmar que não existe diferença significativa entre as variâncias e, portanto, a gama de trabalho é adequada.

Na tabela 16 estão representados os resultados obtidos para a validação da gama de trabalho do método de determinação de anião nitrito, com os padrões de $10\mu\text{gL}^{-1}$ e $30\mu\text{gL}^{-1}$,

Tabela 16: Resultados obtidos para o cálculo da homogeneidade das variâncias dos padrões de anião nitrito

Padrão	10 μgL^{-1}	30 μgL^{-1}
Concentração / μgL^{-1}	10,49	30,38
	10,56	30,80
	10,13	30,55
	10,88	30,55
	10,37	30,72
	10,19	30,63
	10,10	30,21
	10,34	30,38
	10,33	29,61
	10,07	29,87

Tabela 17: Cálculo da homogeneidade das variâncias dos padrões de anião nitrito

Padrão / μgL^{-1}	Desvio Padrão	Variância	F_{exp}	F_{crit} (99%)
10,00	$2,49 \times 10^{-1}$	$6,22 \times 10^{-2}$	2,31	5,35
30,00	$3,79 \times 10^{-1}$	$1,44 \times 10^{-1}$		

Pela análise da tabela 17, pode-se verificar um valor de F_{exp} inferior a F_{crit} , o que demonstra que a gama de trabalho escolhida é adequada para a determinação do anião nitrito.

Por fim, na tabela 18, estão representados os resultados obtidos para a validação da gama de trabalho do método de determinação de catião amónio, com os padrões de $30\mu\text{gL}^{-1}$ e $100\mu\text{gL}^{-1}$.

Tabela 18: Resultados obtidos para o cálculo da homogeneidade das variâncias dos padrões de catião amónio

Padrão	30 μgL^{-1}	100 μgL^{-1}
Concentração / μgL^{-1}	30,74	99,42
	30,72	98,16
	30,70	97,56
	30,35	99,89
	31,31	99,94
	30,96	98,69
	31,27	98,74
	30,27	98,79
	30,58	99,17
	30,88	99,54

Tabela 19: Cálculo da homogeneidade das variâncias dos padrões de catião amónio

Padrão / μgL^{-1}	Desvio Padrão	Variância	F_{exp}	F_{crit} (99%)
30,00	$3,4 \times 10^{-1}$	$1,2 \times 10^{-1}$	4,87	5,35
100,00	$7,6 \times 10^{-1}$	$5,7 \times 10^{-1}$		

Analisando os resultados obtidos na tabela 19, pelo teste F, podemos verificar que F_{exp} é inferior a F_{crit} o que nos permite afirmar que a gama de trabalho está bem ajustada para este método.

Pode-se então concluir que existe homogeneidade de variâncias e a gama de trabalho está bem ajustada para os métodos em estudo.

10.1.4. Sensibilidade

Uma vez que os três métodos em estudo se baseiam num modelo de função linear, para analisar a sensibilidade dos métodos, calculou-se o declive médio de 10 retas de calibração. Na tabela 20 encontram-se representados os valores de declives obtidos para o método de determinação de anião nitrato.

Tabela 20: Resultados obtidos de 10 retas de calibração do anião nitrato

Data	Declive / Lmg^{-1}
18-03-2014	345
21-03-2014	365
25-03-2014	353
27-03-2014	336
07-05-2014	374
09-05-2014	364
12-05-2014	355
01-04-2014	342
01-04-2014	337
13-03-2014	336

Pela análise da tabela 20, podemos calcular o declive médio, obtendo o valor de 351 Lmg^{-1} , com um desvio padrão de 14 Lmg^{-1} e uma incerteza a 95% de 27.

Tabela 21: Resultados obtidos de 10 retas de calibração de anião nitrito

Data	Declive / $\text{L}\mu\text{g}^{-1}$
12-03-2014	11,6
20-03-2014	10,8
25-03-2014	13,4
27-03-2014	11,6
16-04-2014	11,7
09-04-2014	11,4
09-04-2014	11,5
02-05-2014	11,5
07-05-2014	10,9
09-05-2014	11,7

Na tabela 21 estão apresentados os valores de declive obtidos de 10 retas de calibração de anião nitrito. Podemos afirmar que o declive médio é de $11,6 \text{ L}\mu\text{g}^{-1}$, com um desvio padrão de $0,7 \text{ L}\mu\text{g}^{-1}$ e uma incerteza a 95% de 1,4.

Tabela 22: Resultados obtidos de 10 retas de calibração de catião amónio

Data	Declive/ $\text{L}\mu\text{g}^{-1}$
06-05-2014	2,9
06-05-2014	2,9
02-04-2014	2,4
24-04-2014	2,5
16-04-2014	2,6
09-04-2014	2,7
09-04-2014	2,7
03-04-2014	2,4
15-01-2014	3,0
12-03-2014	2,6

Por fim, estão apresentados na tabela 22 os vários valores obtidos de declive do método de determinação de catião amónio. Podemos afirmar que o declive médio, neste caso, é de $2,7 \text{ L}\mu\text{g}^{-1}$, com um desvio padrão de $0,2 \text{ L}\mu\text{g}^{-1}$ e uma incerteza a 95% de 0,4.

10.1.5. Precisão

A precisão do método foi avaliada através da repetibilidade e da precisão intermédia. Neste estudo não foi possível avaliar a reprodutibilidade do método.

10.1.5.1. Repetibilidade

O estudo da repetibilidade para cada método foi determinado realizando 10 ensaios com dois padrões de diferentes gamas, em condições experimentais iguais. Neste caso foram utilizados os padrões mais diluídos e os padrões mais concentrados dos três métodos em estudo. A repetibilidade foi avaliada pelo desvio padrão de repetibilidade e aceita-se este valor se for inferior a 10%

Tabela 23: Estudo da repetibilidade do método de determinação de anião nitrato

	$[\text{NO}_3^-] / \text{mgL}^{-1}$	$[\text{NO}_3^-] / \text{mgL}^{-1}$
Valor teórico	2,0	10,0
Valores obtidos	2,14	9,71
	2,10	9,77
	2,15	9,86
	2,15	9,84
	2,20	9,81
	2,15	9,81
	2,17	9,86
	2,17	9,79
	2,17	9,82
	2,15	9,87
Desvio padrão, DP	0,026	0,049
DP Expandido (95%)	0,052	0,098
Média	2,16	9,81

Pela tabela 23, podemos calcular o desvio padrão e o desvio padrão expandido (DPE) para um grau confiança de 95% de cada padrão. Para o padrão mais diluído, obtemos um desvio padrão de 1,2% e para o padrão mais concentrado, 0,5%, com um DPE de 2,4% e 1,0% respetivamente.

Tabela 24: Estudo da repetibilidade do método de determinação de anião nitrito

	$ \text{NO}_2^- / \mu\text{gL}^{-1}$	$ \text{NO}_2^- / \mu\text{gL}^{-1}$
Valor teórico	10,0	30,0
Valores obtidos	10,49	30,38
	10,56	30,80
	10,13	30,55
	10,88	30,55
	10,37	30,72
	10,19	30,63
	10,10	30,21
	10,34	30,38
	10,33	29,61
	10,07	29,87
Desvio padrão, DP	0,25	0,38
DP Expandido (95%)	0,50	0,76
Média	10,35	30,37

De acordo com a tabela 24, podemos calcular o desvio padrão e o desvio padrão expandido (DPE) para um grau confiança de 95% de cada padrão. Para o padrão mais diluído, obtemos um desvio padrão de 2,4% e para o padrão mais concentrado, 1,2%, com um DPE de 4,8% e 2,5% respetivamente.

Tabela 25: Estudo da repetibilidade do método de determinação de catião amónio

	$ \text{NH}_4^+ / \mu\text{gL}^{-1}$	$ \text{NH}_4^+ / \mu\text{gL}^{-1}$
Valor teórico	30,0	100,0
Valores obtidos	30,74	99,42
	30,72	98,16
	30,70	97,56
	30,35	99,89
	31,31	99,94
	30,96	98,69
	31,27	98,74
	30,27	98,79
	30,58	99,17
	30,88	99,54
Desvio padrão, DP	0,34	0,76
DP Expandido (95%)	0,69	1,5
Média	30,78	98,99

Pela tabela 25, podemos calcular o desvio padrão e o desvio padrão expandido (DPE) para um grau confiança de 95% de cada padrão. Para o padrão mais diluído,

obtemos um desvio padrão de 1,1% e para o padrão mais concentrado, 0,8%, com um DPE de 2,2% e 1,5% respetivamente.

A repetibilidade de um método pode ser avaliada através do desvio padrão de repetibilidade. Quando este valor é superior a 10% considera-se que o método apresenta pouca repetibilidade. Analisando os resultados obtidos podemos afirmar que de uma maneira geral os três métodos têm boa repetibilidade, visto que os valores são todos inferiores a 10%.

10.1.5.2. Precisão intermédia

A precisão intermédia foi determinada fazendo 10 medições de padrões de diferentes gamas realizados ao longo do tempo. Neste caso o único fator de variação foi o fator tempo. Foram utilizados dois padrões de concentração diferente de cada método, em dias diferentes. A precisão intermédia foi avaliada pelo desvio padrão da precisão intermédia e aceita-se este valor se for inferior a 10%

Nas tabelas 26 e 27 estão representados os valores obtidos dos padrões do método de determinação de anião nitrato.

Tabela 26: Determinação da precisão intermédia do método de determinação de anião nitrato, usando o padrão de 2mgL⁻¹

Dia		$ \text{NO}_3^- \text{ / mgL}^{-1}$
	Valor teórico	2,00
25-03-2014	Valores obtidos	2,10
25-03-2014		2,03
08-04-2014		2,09
21-03-2014		2,01
18-03-2014		2,04
26-03-2014		2,14
27-03-2014		2,07
23-04-2014		2,06
23-04-2014		2,14
08-04-2014		2,05
Desvio padrão, DP		0,044
DP Expandido (95%)		0,088
Média		2.07

Tabela 27: Determinação da precisão intermédia do método de determinação de anião nitrato, usando o padrão de 10mgL⁻¹

Dia		$[\text{NO}_3^-] / \text{mgL}^{-1}$
	Valor teórico	10,00
18-03-2014	Valores obtidos	10,00
09-05-2014		10,09
21-03-2014		10,10
25-03-2014		10,06
26-03-2014		10,00
07-05-2014		10,04
10-04-2014		10,21
28-04-2014		10,16
16-04-2014		10,30
16-04-2014		10,22
Desvio padrão, DP		0,10
DP Expandido (95%)		0,20
Média		10,12

Pela análise das tabelas 26 e 27 podemos calcular o desvio padrão e o desvio padrão expandido (DPE) para um grau de confiança de 95%, de cada um dos padrões analisados. Para o padrão mais diluído, obtém-se um desvio padrão de 2,1%, com um DPE de 4,3%. Para o padrão de 10mg/L, obtemos um desvio padrão de 1,0%, com DPE de 2,0%.

Nas tabelas 28 e 29 estão representados os valores obtidos dos padrões para o anião nitrito.

Tabela 28: Determinação da precisão intermédia do método de determinação de anião nitrito, usando o padrão de 10µgL⁻¹

Dia		$[\text{NO}_2^-] / \mu\text{gL}^{-1}$
	Valor teórico	10,00
12-03-2014	Valores obtidos	10,63
20-03-2014		10,74
25-03-2014		10,90
09-04-2014		10,62
23-04-2014		10,46
23-04-2014		10,24
23-04-2014		10,53
27-03-2014		10,62
09-04-2014		10,76
02-05-2014		10,66
Desvio padrão, DP		0,18
DP Expandido (95%)		0,36
Média		10,65

Tabela 29: Determinação da precisão intermédia do método de determinação de anião nitrito, usando o padrão de $30\mu\text{gL}^{-1}$

Dia		$ \text{NO}_2^- / \mu\text{gL}^{-1}$
	Valor teórico	30,00
25-03-2014	Valores obtidos	29,94
25-03-2014		29,65
23-04-2014		30,37
23-04-2014		29,57
24-04-2014		29,92
02-05-2014		30,23
02-05-2014		30,51
24-04-2014		30,51
13-05-2014		29,83
15-05-2014		30,83
Desvio padrão, DP		0,40
DP Expandido (95%)		0,80
Média		30,10

Pela análise das tabelas 28 e 29, podemos concluir que os desvios padrão de cada uma das concentrações são de 1,2% para o padrão de $10\mu\text{gL}^{-1}$, e de 1,7% para o padrão de $30\mu\text{gL}^{-1}$, com DPE de 2,4% e 3,4% respectivamente.

Por fim, estão apresentados nas tabelas 30 e 31 os valores obtidos dos padrões para o catião amónio.

Tabela 30: Determinação da precisão intermédia do método de determinação de catião amónio, usando o padrão de $30\mu\text{gL}^{-1}$

Dia		$ \text{NH}_4^+ / \mu\text{gL}^{-1}$
	Valor teórico	30,00
06-05-2014	Valores obtidos	29,65
09-04-2014		29,46
09-04-2014		29,41
27-03-2014		30,08
12-03-2014		29,94
29-01-2014		30,40
09-04-2014		29,40
09-04-2014		30,61
14-05-2014		29,78
14-05-2014		30,86
Desvio padrão, DP		0,52
DP Expandido (95%)		1,0
Média		29,96

Tabela 31: Determinação da precisão intermédia do método de determinação de catião amónio, usando o padrão de 100µgL⁻¹

Dia		$ \text{NH}_4^+ / \mu\text{gL}^{-1}$
	Valor teórico	100,00
29-01-2014	Valores obtidos	100,91
20-03-2014		99,95
04-04-2014		98,40
04-04-2014		99,92
09-04-2014		99,64
03-04-2014		98,86
03-04-2014		100,77
04-04-2014		100,36
15-05-2014		100,68
15-05-2014		100,23
Desvio padrão, DP		0,82
DP Expandido (95%)		1,64
Média		99,97

Analisando as tabelas 30 e 31, obtemos um desvio padrão de 1,7% para o padrão de 30µgL⁻¹, e de 0,8% para o padrão de 100µgL⁻¹, com DPE de 3,5% e 1,6%, respetivamente.

De uma maneira geral, analisando os valores obtidos de precisão intermédia para os três métodos em estudo, podemos afirmar que todos têm desvios padrão de precisão intermédia inferiores a 10%.

10.1.6. Exatidão

A exatidão, neste caso, foi avaliada através de ensaios interlaboratoriais. Durante o período de validação dos métodos de análise de anião nitrato, anião nitrito e catião amónio, realizou-se um ensaio interlaboratorial, de modo a ser possível avaliar a exatidão do método. As amostras foram enviadas a 6 de novembro pela AQUACHECK PT Scheme e analisadas imediatamente, e também passado uma semana de modo a confirmar os resultados obtidos inicialmente.

Em relação ao método de determinação de anião nitrato, a amostra foi analisada sem tratamento prévio para saber a ordem de grandeza da concentração da amostra e concluiu-se que era necessário fazer diluições. Os resultados finais obtidos estão apresentados na tabela 32.

Tabela 32: Cálculo do z-score dos resultados obtidos para o método de determinação de anião nitrato

Data	$[\text{NO}_3^-]_{\text{lab}} / \text{mgL}^{-1}$	$[\text{NO}_3^-]_{\text{ref}} / \text{mgL}^{-1}$	S	Z score
7-11-2014	28,78	27,06	2,030	0,51
7-11-2014	27,39			0,85
7-11-2014	28,09			0,16
14-11-2014	24,37			-1,33

De acordo com os resultados obtidos de Z-score, uma vez que se devem encontrar entre -3 e +3, pode-se afirmar que os resultados foram satisfatórios. Nomeadamente ao estudo da exatidão do método, apenas uma amostra não nos permite retirar conclusões mais concretas. Analisando com mais atenção a tabela 32, é de notar que o valor de concentração em anião nitrato, dimiui na segunda semana de análise da amostra. Não se pode concluir nada acerca deste facto. Apenas fazendo uma nova análise numa terceira semana é que poderia ajudar a entender-se se haveria uma tendência à concentração da amostra para diminuir com o tempo, mas como a quantidade de amostra era reduzida, não foi possível uma nova análise.

Relativamente à concentração em anião nitrito da amostra, foi feito o mesmo procedimento que no caso de anião nitrato, sendo a amostra analisada sem tratamento prévio de modo a saber a ordem de grandeza da concentração da amostra. Concluiu-se que era necessário fazer diluições. Os resultados obtidos estão apresentados na tabela 33.

Tabela 33: Cálculo do z-score dos resultados obtidos para o método de determinação de anião nitrito

Data	$[\text{NO}_2^-]_{\text{lab}} / \mu\text{gL}^{-1}$	$[\text{NO}_2^-]_{\text{ref}} / \mu\text{gL}^{-1}$	S	Z score
6-11-2014	0,071	0,074	0,0056	-0,54
15-11-2014	0,073			-0,18

Pela análise dos valores de Z-score, uma vez que se encontram dentro do limite e perto de zero, então os resultados foram satisfatórios. Mais uma vez, apenas uma amostra não é suficiente para tirar conclusões definitivas.

Na análise do catião amónio, analisou-se a amostra também quando foi recebida e uma semana depois. Foi necessário fazer diluições e os resultados obtidos encontram-se na tabela 34.

Tabela 34: Cálculo do z-score dos resultados obtidos para o método de determinação de catião amónio

Data	$[\text{NH}_4^+]_{\text{lab}} / \mu\text{gL}^{-1}$	$[\text{NH}_4^+]_{\text{ref}} / \mu\text{gL}^{-1}$	S	Z score
7-11-2014	0,259	0,190	0,0250	2,76
15-11-2014	0,200			0,40
15-11-2014	0,207			0,68

Pela análise dos valores de Z-score, estes encontram-se entre -3 e +3, o que é satisfatório. Pode-se reparar também que os valores de concentração entre as duas semanas, são diferentes. Como para o anião nitrato, era desejável fazer uma nova análise numa terceira semana de modo a verificar se a concentração tinha tendência a diminuir com o tempo. Devido à reduzida quantidade de amostra, não foram possíveis novas análises.

Concluiu-se então que os três métodos em estudo tiveram um resultado satisfatório no ensaio interlaboratorial do dia 6 de novembro de 2013. Estes resultados não permitem retirar conclusões definitivas acerca da exatidão dos métodos, por consistirem em apenas na análise de uma amostra. No entanto fornecem boas indicações nesse sentido.

10.1.7. Limite de deteção / Limite de quantificação

No cálculo dos limites de deteção, utilizaram-se os dados obtidos das curvas de calibração do estudo da sensibilidade. Caso se pretenda utilizar dados de uma curva de calibração linear, o limite de deteção para um grau de confiança de 99,9% é dado pela equação:

$$LD = \frac{3.3 S_{y/x}}{b}$$

Em que $S_{y/x}$ é o desvio padrão, e b é o declive da curva de calibração.

Tabela 35: Valores para o cálculo dos limites de deteção dos métodos

	NO_3^-	NO_2^-	NH_4^+
$S_{y/x}$	9,29	2,10	4,24
b	351	11,6	2,7

Obtém-se da tabela 35 os limites de deteção dos três métodos em estudo, anião nitrato, anião nitrito e catião amónio, os valores do limite de deteção são $0,087\text{mgL}^{-1}$, $0,60\mu\text{gL}^{-1}$ e $5,2\mu\text{gL}^{-1}$, respetivamente.

Os limites de quantificação dos métodos foram obtidos a partir do estudo da precisão intermédia. Segundo a RELACRE, se da análise de 10 valores de concentração de padrão (gamas diferentes), se determinar o desvio padrão e o desvio

padrão expandido para cada gama e esses valores forem inferiores a 10%, considera-se como limite de quantificação o valor do padrão mais baixo [52].

Pela análise das tabelas de precisão intermédia, 26-31, verifica-se que todos os valores são inferiores a 10%, considera-se então que os limites de quantificação são os padrões mais baixos de cada método, para o anião nitrato, 2 mgL^{-1} , para o anião nitrito, $10 \mu\text{gL}^{-1}$ e para o catião amónio $30 \mu\text{gL}^{-1}$.

11. Controlo de qualidade dos métodos validados

O controlo de qualidade foi feito através da análise de dois padrões de controlo para cada método. A concentração de um dos padrões de controlo era igual à concentração do padrão de concentração mais baixa das curvas de calibração. O outro padrão de controlo tinha a mesma concentração do padrão mais concentrado da curva de calibração.

O padrão de controlo de concentração mais baixa era analisado a cada 10 amostras. O padrão de controlo mais concentrado, era analisado uma vez, no final de cada sessão de análise. O estudo foi feito no mês de maio e início de mês de junho e foi feito o controlo todas as semanas, sendo numeradas segunda a tabela 36.

Tabela 36: Calendário das semanas analisadas

Semana	Dias
1	5 – 9 maio
2	12 – 16 maio
3	19 – 23 maio
4	26 – 30 maio
5	2 – 6 junho

Não houve registos na semana 4, pois não foram analisadas amostras nesses dias.

11.1. Determinação da capacidade (desvio padrão) do processo analítico

Foram analisadas uma série de duplicados de cada parâmetro, de modo a estabelecer os valores de desvio padrão (s) para os limites das cartas de controlo. Os resultados estão apresentados em seguida, nas tabelas 37-42. Para obtermos o valor de s, consultou-se uma tabela de constantes de cartas de controlo, onde o valor foi calculado usando a expressão seguinte:

$$R = sd_2$$

R é a média das amplitudes dos duplicados e d_2 é uma constante tabelada. Consultando a tabela, como analisamos duplicados, o tamanho da amostra é 2, logo o valor de d_2 é de 1,128.

Os resultados obtidos para o anião nitrato estão apresentados na tabela 37.

Tabela 37: Resultados da análise de duplicados de anião nitrato

Data	Duplicados		$ X_1 - X_2 / \text{mgL}^{-1}$
	X_1 / mgL^{-1}	X_2 / mgL^{-1}	
09/10/2013	8,08	8,04	0,04
14/10/2013	6,70	6,80	0,10
16/10/2013	10,24	10,36	0,12
16/10/2013	6,20	6,15	0,05
29/10/2013	8,91	9,06	0,15
05/11/2013	2,36	2,35	0,01
20/11/2012	8,53	7,99	0,54
12/11/2014	3,85	3,88	0,03
06/12/2013	3,18	3,23	0,05
10/12/2013	8,70	8,95	0,25
10/12/2013	3,91	3,92	0,01
08/01/2014	4,62	4,65	0,03
08/01/2014	2,89	2,92	0,03
15/01/2014	6,47	6,45	0,02
21/01/2014	2,01	2,05	0,04
23/01/2014	6,42	6,44	0,02
08/04/2014	6,90	7,03	0,13
13/05/2014	5,62	5,58	0,04
13/05/2014	11,48	11,55	0,07
03/06/2014	3,90	3,95	0,05
04/06/2014	4,10	4,28	0,18

Tabela 38: Determinação do desvio padrão para as cartas de controlo do método de determinação de anião nitrato

R	d_2	s / mgL^{-1}
0,093	1,128	0,083

Pela análise da tabela 38, conclui-se que o valor de desvio padrão para as cartas de controlo do anião nitrato é $0,12\text{mgL}^{-1}$.

Tabela 39: Resultados da análise de duplicados de anião nitrito

Data	Duplicados		$ X_1 - X_2 / \mu\text{gL}^{-1}$
	$X_1 / \mu\text{gL}^{-1}$	$X_2 / \mu\text{gL}^{-1}$	
14/10/2014	14,23	14,17	0,06
29/10/2014	10,81	11,12	0,31
13/11/2013	16,59	16,48	0,11
28/11/2014	15,29	14,66	0,63
15/01/2014	15,13	14,17	0,96
04/02/2014	21,00	22,01	1,01
16/04/2014	24,12	26,98	2,86

Pela análise da tabela 39, relativa aos resultados dos duplicados de anião nitrito, verifica-se que se tem menos valores que o método anterior, o de determinação de anião nitrato. Isto deve-se às concentrações dos duplicados em análise. As amostras em duplicado tinham concentração muito baixa em anião nitrito, por isso muitos dos duplicados ficaram abaixo do limite de quantificação, e, por essa razão, não foram usados na determinação do desvio padrão.

Tabela 40: Determinação do desvio padrão para as cartas de controlo do método de determinação de anião nitrito

R	d ₂	s / µg L ⁻¹
0,85	1,128	0,75

Pela tabela 40, obtemos o valor do desvio padrão para as cartas de controlo de anião nitrito, que é de 0,75 µg L⁻¹.

Tabela 41: Resultados da análise de duplicados de catião amónio

Data	Duplicados		X ₁ - X ₂ / µg L ⁻¹
	X ₁ / µg L ⁻¹	X ₂ / µg L ⁻¹	
14/10/2013	48,73	46,60	2,13
06/11/2013	80,23	78,21	2,02
06/11/2013	59,81	59,73	0,08
13/11/2013	35,84	35,79	0,05
22/11/2013	58,76	58,91	0,15
28/11/2013	111,75	110,99	0,76
11/12/2013	39,13	40,23	1,10
18/12/2013	31,97	33,72	1,75
09/01/2014	101,98	104,16	2,18
29/01/2014	41,70	37,84	3,86
02/05/2014	41,32	47,54	6,22
17/06/2014	62,85	64,86	2,01

Tabela 42: Determinação do desvio padrão para as cartas de controlo do método de determinação de anião nitrato

R	d ₂	s / µg L ⁻¹
1,86	1,128	1,65

Pela avaliação dos duplicados de catião amónio, pelas tabelas 41 e 42, obtemos um valor de desvio padrão de 1,65 µg L⁻¹.

Os valores obtidos de s dos três métodos serão utilizados em seguida na construção das respetivas cartas de controlo.

11.2. Cartas de controlo

As cartas de controlo dos três métodos em estudo foram construídas usando os valores de s obtidos através da análise de duplicados feita anteriormente. O tipo de carta utilizada foi a de Shewart, e posteriormente construíram-se também as cartas de zona nas situações em que se verificou perda de controlo. Foram construídas duas cartas de controlo para cada método, sendo uma referente à análise do padrão de concentração mais baixa e outra referente ao padrão de concentração mais alta.

As cartas encontram-se divididas por semanas, para analisar melhor a evolução ao longo do tempo. As semanas não têm todas o mesmo número de padrões analisados, devido à quantidade de amostras entre semanas ser diferente.

Nas figuras 30 e 31, estão apresentadas as cartas de controlo dos padrões de 2mgL^{-1} e 10mgL^{-1} do método de determinação de anião nitrato.

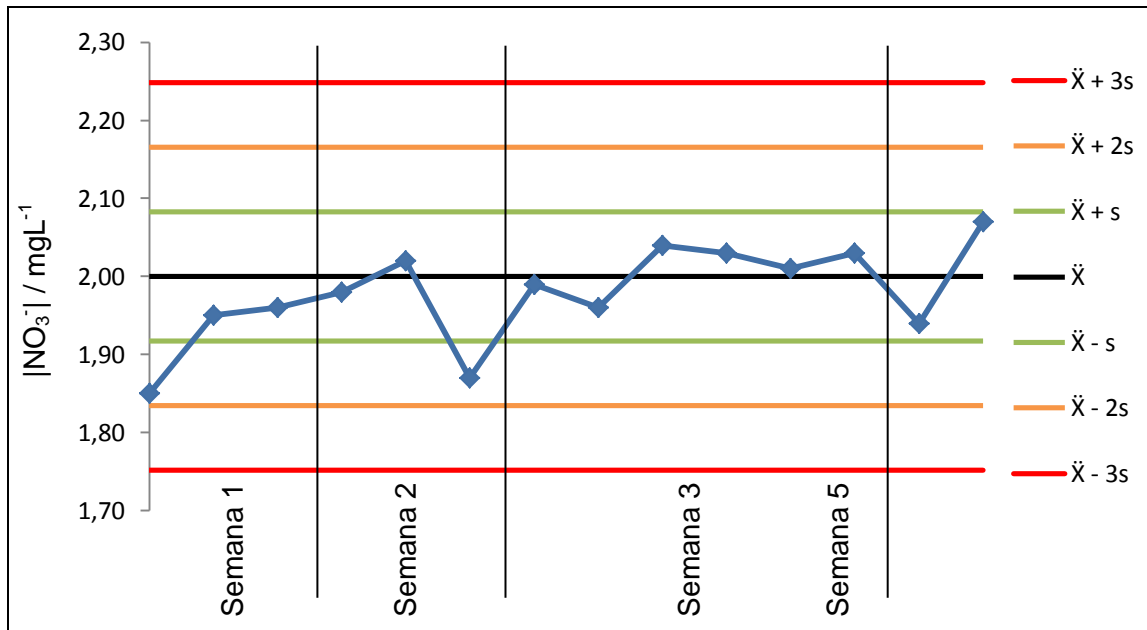


Figura 30: Carta de controlo do padrão de 2mgL^{-1} em anião nitrato

Pela análise da carta de controlo do padrão de 2mgL^{-1} , da figura 30, podemos afirmar que o sistema esteve sob controlo, estando todos os valores dentro da linha de aviso nas quatro semanas de teste.

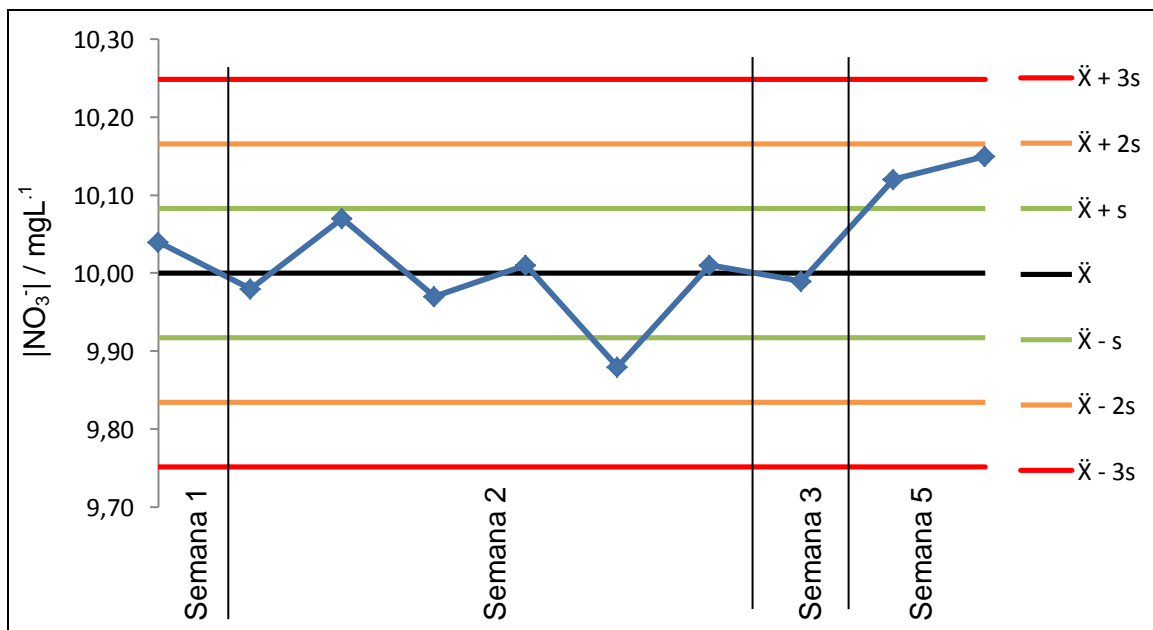


Figura 31: Carta de controlo do padrão de 10mgL^{-1} em anião nitrato

Relativamente à carta de controlo do padrão de 10mgL^{-1} , representado na figura 31, a situação é semelhante ao do outro padrão, há flutuações dos valores entre as linhas de aviso, o que demonstra que o sistema está sob controlo.

Nas figuras 32 e 33 estão apresentadas as cartas de controlo do método de determinação de anião nitrito.

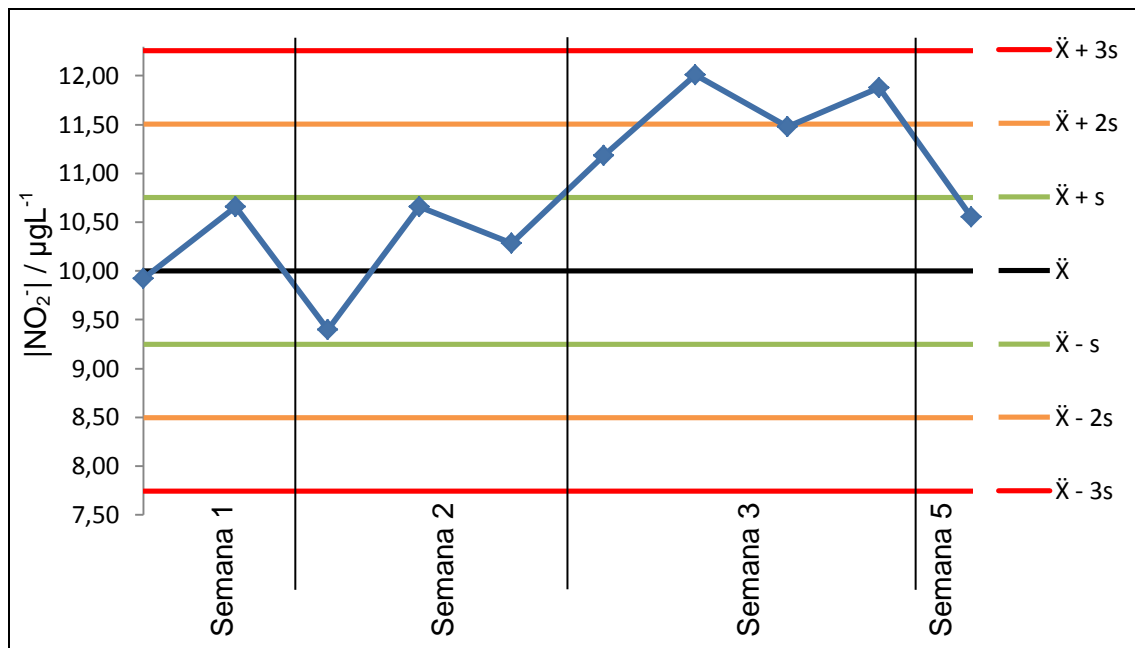


Figura 32: Carta de controlo do padrão de $10\mu\text{gL}^{-1}$ em anião nitrito

Observando a carta de controlo para o padrão de $10\mu\text{gL}^{-1}$ em anião nitrito, na figura 32, verifica-se que numa das semanas de análise os valores situavam-se acima da linha superior de aviso. Como no caso do anião nitrito, todas as semanas são preparados novos padrões de controlo, isto pode indicar que pode ter ocorrido uma contaminação ou os padrões foram mal preparados. Pelas regras deste tipo de carta de controlo, houve perda de controlo por estarem dois pontos em três consecutivos fora das linhas de aviso. Na semana 5 o valor obtido já se encontra dentro dos limites da carta de controlo.

Devido aos resultados obtidos desta carta de controlo irá ser feita mais adiante uma comparação desta com a carta de controlo de zona, de modo a verificar qual nos indicaria mais atempadamente que o sistema pudesse estar fora de controlo.

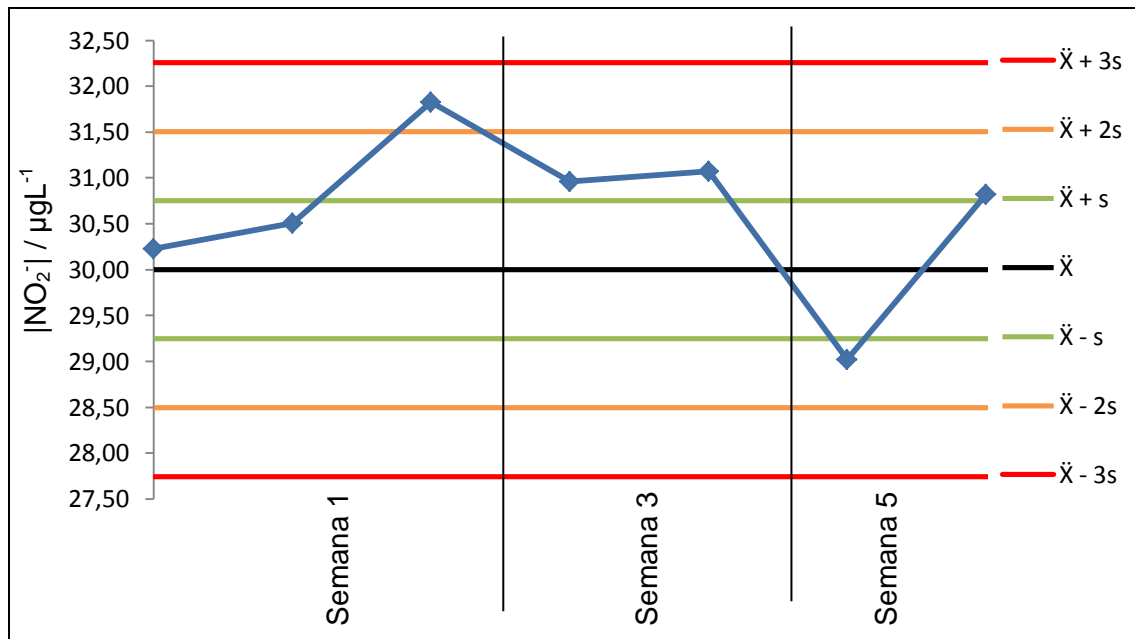


Figura 33: Carta de controlo do padrão de $30\mu\text{gL}^{-1}$ em anião nitrito

Antes de analisar os valores obtidos da carta de controlo do padrão de $30\mu\text{gL}^{-1}$ em anião nitrito, é de notar que não existem valores na segunda semana de análise. Pela análise da carta de controlo obtida, verifica-se que na primeira semana obtém-se um valor acima da linha superior de aviso da carta de controlo. Nas restantes semanas os valores mantêm-se dentro dos limites da carta de controlo, o que demonstra que o sistema esteve sob controlo para as concentrações mais elevadas.

Por último, nas figuras 34 e 35 encontram-se as cartas de controlo para o método de determinação de catião amónio. Não existem resultados na semana três, pois este parâmetro não foi analisado durante essa semana.

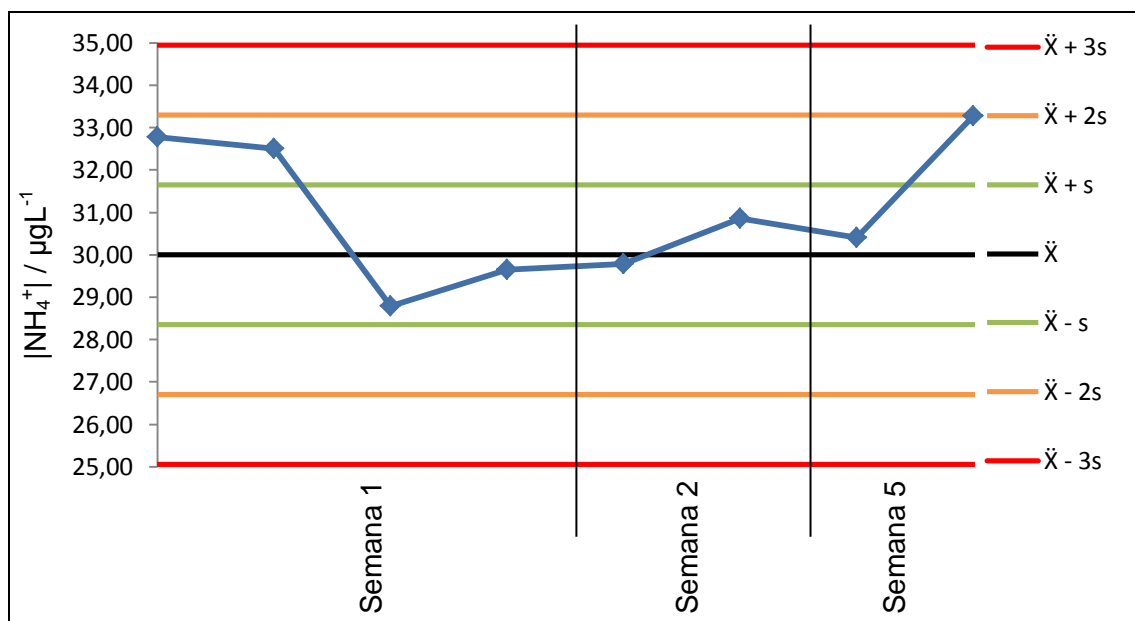


Figura 34: Carta de controlo do padrão de $30\mu\text{gL}^{-1}$ em catião amónio

Analisando a carta de controlo do padrão de $30\mu\text{gL}^{-1}$ em catião amónio, da figura 34, verifica-se que o sistema esteve sob controlo, pois todos os pontos estão a oscilar em torno da linha média, sem ultrapassar os limites de aviso da carta. Verifica-se que o último valor obtido para a carta encontra-se em cima da linha superior de aviso, o que não é suficiente para tirar conclusões acerca da perda de estabilidade do sistema.

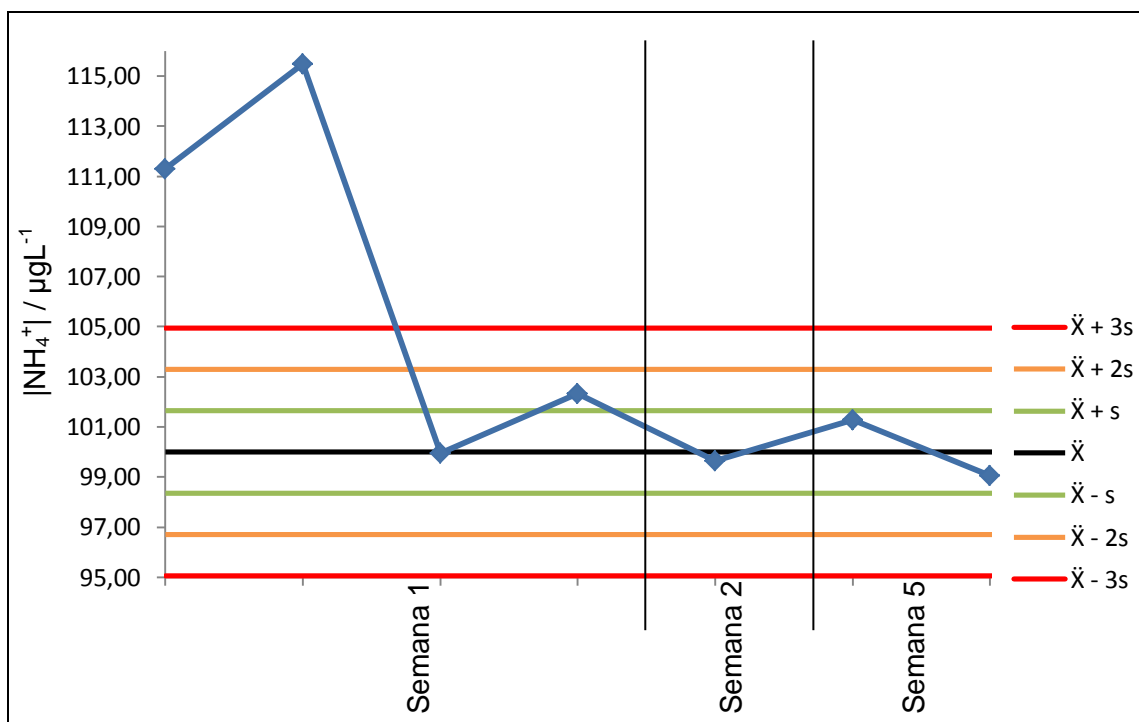


Figura 35: Carta de controlo do padrão de $100\mu\text{gL}^{-1}$ em catião amónio

Numa primeira análise da figura 35, é evidente que na semana 1 estão dois pontos muito fora da linha superior de controlo. As medidas tomadas foram de preparar um novo padrão e analisar os resultados obtidos. Como nessa mesma semana, os dois pontos seguintes, do novo padrão preparado, encontravam-se dentro das linhas de aviso, pode-se afirmar que o padrão utilizado nos dois primeiros pontos pudesse estar mal preparado.

Observando os valores obtidos nas restantes semanas, é possível verificar que o sistema encontra-se sob controlo, os padrões além de oscilarem em torno do valor desejado, encontram-se próximos deste mesmo.

Comparação entre cartas de controlo de Shewart e cartas de controlo de zona

Escolheu-se uma das cartas de controlo de Shewart anteriores que mostrava um sistema a perder o controlo para se fazer uma comparação com a carta de controlo de

zona. Visualmente, em termos das linhas de aviso e de controlo, estes dois tipos de carta são muito semelhantes, pois possuem os mesmos limites, mas a de controlo de zona possui uma característica, dá valores aos pontos na carta que ultrapassem os limites, tanto superiores como inferiores. A carta de controlo encontra-se representada na figura 36.

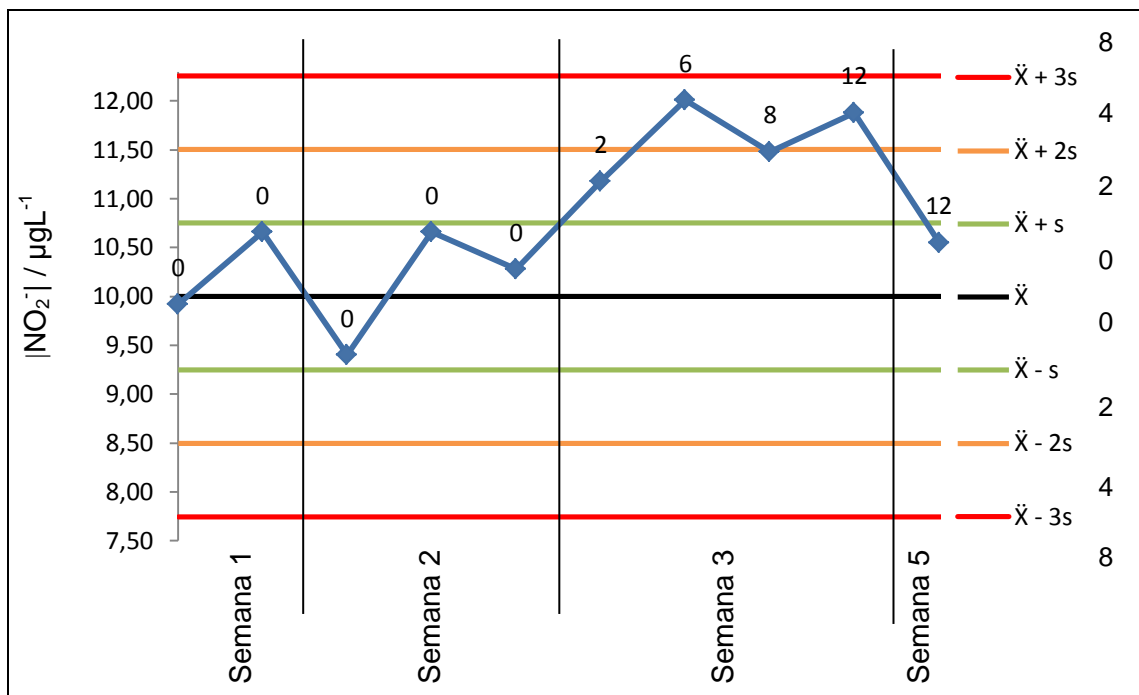


Figura 36: Carta de controlo de zona do padrão de 10µg/L⁻¹ em anião nitrito

A carta utilizada foi a do padrão de 10µg/L⁻¹ de anião nitrito. Como referido anteriormente, pode-se verificar uma perda de controlo na semana três de análise, devido a obterem-se dois pontos em três consecutivos fora da linha superior de aviso.

Nas cartas de controlo de zona, considera-se que quando se obtém uma pontuação igual ou superior a 8, o sistema poderá estar fora de controlo. Observando os resultados da carta obtida para o padrão de 10µg/L⁻¹ em anião nitrito, pode-se verificar que o sistema estava a ficar fora de controlo a meio da semana 3.

Analisando visualmente ambos os tipos de carta, podemos verificar que em ambas as cartas, havia pontos fora dos limites de aviso e que o sistema estava a ficar fora de controlo, mas na carta de controlo de Shewart, isso só se verifica no final da semana 3 de análise, enquanto que na carta de controlo de zona, isso se verifica a meio dessa mesma semana. Pode-se concluir que a carta de controlo de zona é mais eficiente na deteção prévia do sistema estar fora do controlo, e que é também mais fácil, devido a ter uma pontuação, de se observar a estabilidade do sistema.

12. Conclusões

Este trabalho consistiu no processo de validação e controlo de qualidade dos métodos de determinação de anião nitrato, anião nitrito e catião amónio por espectroscopia de absorção molecular em análise de fluxo contínuo segmentado.

No estudo da seletividade e linearidade dos métodos, conclui-se que os métodos eram seletivos e para todos era adequado um ajuste linear. Podemos concluir também que a gama de trabalho utilizada para cada um dos métodos é adequada.

Na análise da precisão dos métodos, foram avaliados dois fatores, a repetibilidade e a precisão intermédia. Na análise da precisão intermédia do método, apenas foi avaliado a influência do fator tempo nos resultados obtidos. Seria interessante se tivessem variado outros fatores, como o operador ou o equipamento, para obter resultados mais abrangentes da precisão intermédia.

A avaliação da exatidão dos métodos foi obtida pela realização de um ensaio interlaboratorial. Obtiveram-se resultados satisfatórios para todos os métodos. Contudo, não foi possível tirar conclusões definitivas acerca da exatidão dos métodos devido a ter-se analisado apenas uma amostra para cada um dos métodos.

Relativamente ao controlo de qualidade dos métodos em estudo, teria sido enriquecedor se houvessem mais valores para a construção das cartas de controlo, de modo a avaliar a estabilidade do sistema durante mais tempo.

Este trabalho permitiu-me ganhar novos conhecimentos, aprender sobre validação de métodos e controlo de qualidade, e trabalhar com novas técnicas e equipamentos. Para concluir, é importante referir que todos os objetivos planeados no início deste trabalho foram cumpridos.

13. Bibliografia

1. www.apambiente.pt. acedido a 30 de junho de 2014.
2. Ministério do Ambiente, *Decreto-Lei n.º 134/2007*. Diário da República, 2007.
3. *Portaria n.º 394/2008*. Diário da República, 2008.
4. Ministério do Ambiente, *Decreto-Lei nº 236/98*. Diário da República, 1998.
5. Ministério do Ambiente do Ordenamento do Território e do Desenvolvimento Regional, *Relatório do Estado do Ambiente*. Agência Portuguesa do Ambiente, I.P., 2011.
6. Póvoas, M., *Água: Qualidade e Tratamento*. educa - Cultura Científica e Ensino/Aprendizagem da Química, 2012.
7. Abelho, M., *Manual de monitorização microbiológica ambiental* Curso de Especialização Tecnológica em Qualidade Ambiental, 2010.
8. Saraia, P., *Águas Minerais e de Abastecimento Público - Acidez e Basicidade - das Águas*. Faculdade de Ciências da Universidade de Coimbra, 2003.
9. Parlamento Europeu e o Conselho da União Europeia, *Diretiva 2000/60/CE*. Jornal Oficial da União Europeia, 2000.
10. Ministério do Ambiente do Ordenamento do Território e do Desenvolvimento Regional, *Relatório do Estado do Ambiente*. Agência Portuguesa do Ambiente, I.P., 2007.
11. Cordy, G.E., *A Primer on Water Quality*. USGS science for a changing world, 2001.
12. Alley, E.R., *Water Quality Control - Handbook (second edition)*. McGraw-Hill. 2007.
13. Parlamento Europeu e o Conselho da União Europeia, *Diretiva 2008/105/CE*. Jornal Oficial da União Europeia, 2008.
14. Freitas, D., Teixeira, C., Ferreira, M., Amaral, T.A., Castro, L.;Moura, B., *Análise de Nitrato e Amónio em Solo e Água*. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2010.
15. Medina, M., *Inovação e Tecnologia na Formação Agrícola*. Associação dos jovens Agricultores de Portugal, 2009.
16. Toyooki, A., Shinji, F., Yasuo, H.;Hiroshi, M., *Rapid flow injection analysis method for successive determination of ammonia, nitrite, and nitrate in water by gas-phase chemiluminescence* Analytica Chimica Acta, 1997.

17. Vale, B.;Haie, N., *Efeitos Prejudiciais na Saúde Humana Derivados por Ingestão de Nitratos na Zona Vulnerável nº1 (Freguesias: Apúlia, Fão) e na Zona não Vulnerável (Freguesias: Fonte Boa, Gandra, Gemeses, Rio Tinto)* Associação Portuguesa dos Recursos Hídricos 2006.
18. Manahan, S.E., *Environmental Science, Technology and Chemistry*. Environmental Chemistry 2000.
19. Woollard, D.C.;Indyk, H.E., *Colorimetric Determination of Nitrate and Nitrite in Milk and Milk Powders - Use of Vanadium (III) Reduction*. Elsevier, 2013.
20. Narayana, B.;Sunil, K., *A Spectrophotometric Method for the Determination of Nitrite and Nitrate*. Eurasian J. Anal. Chem., 2009.
21. EPAL, *Qualidade da Água para Consumo Humano fornecida pela EPAL*. 2009.
22. Batagini, R.C., *Relatório Técnico da Comissão das águas* Coomissão das Águas, 2012.
23. Arar, E.J., *Determination of Nitrate and Nitrite in Estuarine and Coastal Waters by Gas Segmented Continuous Flow Colorimetric Analysis*. Revision 2.0 1997.
24. Nouroozi, S.;Mirshafian, R., *Flow injection kinetic spectrophotometric method for the determination of trace amounts of nitrite*. Elsevier, 2009.
25. Tovar, A., Moreno, C., Mánuel-Vez, M.;García-Vargas, M., *A simple automated method for the speciation of dissolved inorganic nitrogen in seawater* Analytica Chimica Acta 2002.
26. Moorcroft, M., Davis, J.;Compton, R.G., *Detection and determination of nitrate and nitrite: a review*. Talanta 2001.
27. Molins-Lagua, C., Meseguer-Lloret, S., Moliner-Martinez, Y.;Campins-Falcó, P., *A Guide for selecting the most appropriate method for ammonium determination in water analysis*. Trens in Analytical Chemistry, 2006.
28. Comissão Europeia, *Diretiva «Nitratos» da União Europeia*. 2010.
29. Silva, P.;Haie, N., *Análise da Quantidade de Azoto em Excesso em Solos Agrícolas na Zona Vulnerável nº1* Associação Portuguesa dos Recursos Hídricos, 2006.
30. Lapa, R., Lima, J.;Pinto, I., *Simultaneous determination of nitrite, nitrate, sulphate and phenolic compounds, by sequential injection analysis, in wastewaters*. Analisis, 2000.
31. Mori, H., *Direct Determination of Nitrate using Nitrate Reductase in a Flow System*. Journal of Health Science, 2000.
32. Patton, C.;Kryskalla, J., *Colorimetric Determination of Nitrate Plus Nitrite in Water by Enzymatic Reduction, Automated Discrete Analyzer Methods*. Methods of the National Water Quality Laboratory (Section B), 2011.

33. Antweiler, R., Patton, C.;Taylor, H., *Automated, Colorimetric Methods for Determination of Nitrate plus Nitrite, Nitrite, Ammonium and Orthophosphate ions in Natural Water Samples*. U.S. Geological Survey, 1996.
34. Krorn, M., *Spectrophotometric Determination of Ammonia: A Study of a Modified Berthelot Reaction Using Salicylate and Dichloroisocyanurate*. The Analyst 1980.
35. Rhine, E., Sims, G., Mulvaney, R.;Pratt, E., *Improving the Berthelot Reaction for Determining Ammonium in Soil Extracts and Water*. Soil Science Society of America Journal, 1998.
36. Afkhami, A.;Norooz-As, I., *Micelle-Mediated Extraction and Spectrophotometric Determination of Ammonia in Water Samples utilizing Indophenol Dye Formation*. J. Braz. Chem. Soc., 2008.
37. Markzenco, Z.;Balcerzak, M., *Separation, Preconcentration and Spectrophotometry in Inorganic Analysis*. Elviesier. 2000.
38. Lemos, A., Noble, A., Segat, H., Daronco, I., Pappis, L., Nunes, L.;Neves, L., *Espectrofotometria Visível e Ultravioleta*. Universidade Federal de Santa Maria - Centro de Ciências Naturais e Exatas 2009.
39. Skoog, D., Holler, F.;Nieman, T., *Principles of Instrumental Analysis, 6th ed.* . Cengage Learning. 2007.
40. Zagatto, E., Oliveira, C.;Collins, C., *Classificação e definição dos métodos de análises em fluxo*. Química Nova, 1999.
41. Edwards, J., Bauman, R.;Spence, D., *Air segmented continuous flow analysis in microbore tubing*. Analytica Chimica Acta, 1999.
42. Danet, A., *Environmental Pollution Monitoring - Automatic Analytical Methods for Environmental Monitoring and Control*. University of Bucharest, Faculty of Chemistry. Vol. Chapter III. 2005.
43. Masini, J.C., *Análise por Injeção em Fluxo*. Instituto de Química - Universidade de São Paulo, 2013.
44. Committee, S.M., *4120 - Segmented Continuous Flow Analysis*. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 2011.
45. www.skalar.com. acedido a 14 de julho de 2014.
46. Reynolds Mendes, A., *Implementação e Validação de Métodos Analíticos*. Laboratório Regional de Controlo da Qualidade da Água 2004.
47. American Public Health Association, *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 1999.
48. RELACRE, *Guia Relacre 3 - Validação de Resultados em Laboratórios Químicos*. 1996.
49. Mitra, S.;Brukh, R., *Sample Preparation: An Analytical Perspective (Chapter 1)*, in *John Wiley & Sons*, N.J.I.o.T. Department of Chemistry and Environmental Science, Newark, New Jersey, Editor. 2003.

50. Ribani, M., Grespan Bottoli, C., Collins, C., Jardim, I.;Melo, L., *Validação em Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos*. Quim. Nova, 2004.
51. Divisão de Acreditação de Laboratórios, *Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos*. Coordenação Geral de Acreditação 2010.
52. RELACRE, *Guia Relacre 13: Validação de Métodos Internos de Ensaio em Análise Química*. 2000.
53. ISO 8466-1: *Water quality -- Calibration and evaluation of analytical methods and estimation of performance characteristics* Part 1: Statistical evaluation of the linear calibration function, 2009.
54. Rebelo, M., *Validação de Métodos e Controlo de Qualidade em Análise Química e Microbiológica de Águas*. Departamento de Saúde Ambiental, 2008.
55. Jerome, N.S., *Applying Trend Analysis Techniques to Quality Control Measurements in Radionuclide Metrology*. National Physical Laboratory, 2006.
56. Environment Agency, *Performance Standard for Organisations Undertaking Sampling and Chemical Testing of Water* 2008.
57. ISO/TS, *Water quality — Guidance on analytical quality control for chemical and physicochemical water analysis* 2009.
58. RELACRE, *Guia Relacre 9 - Alguns exemplos de cartas de controlo em laboratórios de análise química*. 1998.
59. Miller, J.;Miller, J., *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*, in *Prentice Hall*. 2010.
60. Azenha, M., *Qualidade de medições analíticas - Métodos de controlo de qualidade*. slides de Introdução aos Métodos Quimiométricos e ao Planeamento Experimental; Faculdade de Ciências da Universidade do Porto,, 2014.
61. ISO 8466-2: *Water quality -- Calibration and evaluation of analytical methods and estimation of performance characteristics*. Part 2: Calibration strategy for non-linear second-order calibration functions, 2001.

Anexo I

Além da validação dos métodos de análise de anião nitrato, anião nitrito e catião amónio, foram também analisados outros parâmetros de rotina durante o estágio. Os parâmetros analisados foram: pH, condutividade, alcalinidade, oxidabilidade ao permanganato de potássio, carência bioquímica de oxigénio (CBO_5) por dois métodos, sólidos suspensos totais, durezas, cloretos, e no autoanalisador, analisou-se a cor e fosfatos. Ao longo do estágio foram analisadas, semanalmente, cerca de 30 amostras para cada parâmetro descrito.

Reproduzem-se em seguida as instruções de trabalho, no formato utilizado no laboratório da APA, para a determinação de todos estes parâmetros.

1. Alcalinidade Total– Método Titrimétrico

1.1. Princípio

A Alcalinidade é definida como a quantidade de iões na água que reagirão para neutralizar iões de hidrogénio. A Alcalinidade é, por conseguinte, uma medição da capacidade da água para neutralizar ácidos. A Alcalinidade total corresponde à transformação de todos os bicarbonatos em ácido carbónico utilizando um determinado indicador.

1.2. Material / Equipamento

Balança

Estufa

Pipetas Automáticas

Buretas de vidro

Pipetas volumétricas

Balões volumétricos

Erlenmeyer's

1.3. Reagentes / Soluções

Ácido Sulfúrico ou Ácido Clorídrico 0,1N

Diluir 3,0mL de ácido sulfúrico concentrado, H_2SO_4 ($d=1,84$) ou 8,3mL de ácido clorídrico concentrado, HCl ($d=1,18$) a 1000mL com água destilada. Titular com uma solução de carbonato de sódio 0,05N.

Ácido Sulfúrico ou Ácido Clorídrico 0,02N

Diluir 200mL de ácido 0,1N a 1000mL com água destilada ou desionizada. Titular o ácido com uma solução de Na_2CO_3 , 0,05N.

Solução de Carbonato de Sódio 0,05N

Secar 3 a 5 gramas de carbonato de sódio, Na_2CO_3 , na estufa a 250°C , durante quatro horas. Após deixar arrefecer em excicador, pesar $2,5 \pm 0,2\text{g}$ do padrão. Transferir para um balão volumétrico de 1000mL e diluir até à marca com água destilada recentemente fervida e arrefecida.

Solução de Heliantina a 0,5%

Indicador de Alaranjado de Metilo.

Dissolver 0,5g de alaranjado de metilo em 100mL de água destilada.

Indicador misto Verde de Bromocresol / Vermelho de Metilo.

Dissolver 100mg de verde de bromocresol, 20mg de vermelho de metilo em 100mL de álcool etílico a 95%.

1.4. Procedimento

Aferição do título

Para fazer a aferição do título da alcalinidade, deve-se pipetar 5mL da solução 0,05N de Na_2CO_3 para um balão de 100 mL e preencher o resto com água destilada. A seguir adiciona-se a solução mista de verde de cremosol e vermelho de metilo (cerca de 0,3mL por matraz) e titular até cor roséa. Deve-se fazer 4 ensaios de aferição (4 amostras).

$$N = \frac{A \times B}{53,00 \times C}$$

Em que:

A - g de Na_2CO_3 ;

B - mL de Na_2CO_3 tomados para titulação;

C - mL de ácidos utilizados.

Medir 100mL de amostra a analisar para um erlenmeyer. Adicionar 4 gotas de um dos indicadores indicados no ponto 1.3. Titular com a solução de ácido 0,1N até se observar a viragem do indicador: de amarelo para laranja forte, quando for utilizado o alaranjado de metilo; de azul a rosa, quando for utilizado o indicador misto. Se o

volume de ácido gasto for inferior a 2,0mL, repete-se a determinação utilizando como titulante uma solução de ácido com concentração 0,02N.

1.5. Cálculos

A alcalinidade é calculada através da seguinte expressão:

$$\text{mg CaCO}_3 / \text{L} = \frac{A \times N \times 50000}{V}$$

Em que:

A - ml de ácido utilizado na titulação

N - normalidade do ácido titulante

V - volume de amostra utilizado

2. Carência Bioquímica de Oxigénio (CBO₅) – (método potenciométrico)

2.1. Princípio

O método consiste em levar a amostra a incubar, na obscuridade, a uma temperatura de 20±1°C, durante um determinado período (5 dias) num frasco completamente cheio e fechado. Determina-se a concentração de oxigénio dissolvido antes e depois do período de incubação. A carência bioquímica de oxigénio (CBO₅) é imputada ao consumo de oxigénio dissolvido por litro de amostra em análise.

2.2. Material e Equipamento

Estufa de incubação com termostato controlado para 20±1°C (excluída de toda a luz para prevenir a possibilidade de produção fotossintética de O.D.).

Frascos do aparelho SP100

Sonda de oxigénio com temperatura e agitador incorporado

2.3. Reagentes

Soluções Salinas

Estas soluções são estáveis durante pelo menos um mês e devem ser conservadas em frascos de vidro na obscuridade. Rejeitam-se as soluções que mostrem sinais de precipitação ou crescimento biológico. Estas soluções produzem um balanço osmótico, tamponizam o pH, fornecem os nutrientes essenciais e vestígios de metais à água destilada.

Solução Padrão de Fosfato

Dissolver 8,5g de di-hidrogenofosfato de potássio KH_2PO_4 , 21,75g de hidrogenofosfato de di-potássio K_2HPO_4 , 33,4g de hidrogeno-fosfato de sódio heptahidratado $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 1,7g de cloreto de amónio NH_4Cl , em 500ml de água destilada e diluir a 1000ml. O pH desta solução tampão deve ser de 7,2 sem ajuste posterior. Alternativamente, dissolver 42,5g de di-hidrogenofosfato de potássio KH_2PO_4 e 1,7g de cloreto de amónio NH_4Cl em 700 ml de água destilada. Ajustar o pH a 7,2 com NaOH a 30% e diluir a 1000ml.

Solução de Sulfato de Magnésio

Dissolver 22,5g de sulfato de magnésio heptahidratado $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, em água destilada e diluir a 1000ml.

Solução de Cloreto de Cálcio

Dissolver 27,5g de cloreto de cálcio anidro CaCl_2 , em água destilada e diluir a 1000ml.

Solução de Cloreto de Ferro (III)

Dissolver 0,25g de cloreto de ferro (III) hexa-hidratado $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, em água destilada e diluir a 1000ml.

Soluções Ácida e Alcalina, 1 N

Para neutralização ou acidificação das amostras:

Solução ácida – Lentamente e com agitação adicionar em água destilada 28ml de ácido sulfúrico concentrado (95%-97%). Diluir a 1000ml.

Solução alcalina – Dissolver 40g de hidróxido de sódio. Diluir a 1000ml.

Solução de Aliltioureia (ATU)

Dissolver 2g de aliltioureia $\text{C}_4\text{H}_8\text{Na}_2\text{S}$, em 500ml de água destilada e diluir a 1000ml. Guardar a 4°C. Esta solução é estável até duas semanas.

Solução Padrão de Glucose e Ácido Glutâmico

Dissolver 150mg de glucose desidratada $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$, e 150mg de ácido glutâmico $\text{HOOC-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CHNH}_2\text{-COOH}$, (ambos previamente secos a 103°C, durante 1 hora) em água destilada e diluir a 1000ml. Preparar esta solução imediatamente antes da sua utilização.

2.4. Procedimento

Método Direto (sem diluição da amostra)

Encher cuidadosamente dois frascos do aparelho SP100 com a amostra a analisar e fechar sem deixar bolhas de ar no seu interior. Juntar 2mL de inóculo por frasco. Proceder à determinação do teor em oxigénio dissolvido nos frascos e guardar na estufa de incubação a $20\pm 1^{\circ}\text{C}$, durante 5 dias. Decorrido este tempo, proceder de igual modo à determinação do teor em oxigénio dissolvido, obtendo-se assim respetivamente o valor inicial e final de oxigénio dissolvido na água.

Método com Diluição da Amostra

Preparação da Água de Diluição

Por cada litro de água destilada ou desmineralizada adicionar 1ml de cada solução salina, (tampão fosfato, sulfato de magnésio, cloreto de cálcio e cloreto de ferro), nesta mesma ordem. Saturar a água de diluição com oxigénio pelo borbulhar suave de ar limpo livre de vapores orgânicos, durante 30 minutos. O valor do oxigénio dissolvido tem que ser pelo menos de 8 mg/L após estabilização. Se necessário adicionar inóculo à água de diluição. É aconselhável preparar a água de diluição imediatamente antes de a usar. A água de diluição mantém-se satisfatória, quando incubada sem inóculo e dentro das condições padrão não absorver mais do que 0,2 mg/L e de preferência não menos que 0,1mg/L. Valores elevados para a depleção do oxigénio estão associados à presença de vapores orgânicos solúveis na água, existentes na atmosfera do laboratório que são absorvidos durante o arejamento da água de diluição.

Inóculo

O inóculo é obtido através da junção de 100g de terra de jardim a 1 litro de água, mistura-se e deixa-se repousar durante 10 minutos. Por fim, adiciona-se 3 a 5 ml do líquido sobrenadante por cada litro de água de diluição. O inóculo ainda se pode preparar usando POLYSEED, da seguinte maneira: Retirar 500ml da água de diluição preparada anteriormente e dissolver uma pastilha nos 500ml com agitação durante uma hora, desta solução por cada 300ml de água de diluição adicionar 2ml de sementeira.

Diluição da Amostra

A amostra deve ser levada à temperatura ambiente. Selecionar o volume de amostra requerido para a diluição, em função do valor de CBO_5 esperado, tomando

em atenção que 30 a 70% da concentração de oxigénio dissolvido inicial, deve ser consumido durante os 5 dias de incubação. No caso de ser difícil estimar o CBO_5 pode-se tomar como guia as diluições de: 0,01 a 1,0% para águas residuais industriais, 1 a 5% para águas residuais brutas, 5 a 25% para efluentes biologicamente tratados e 25 a 100% para águas de rios poluídos. Em alternativa pode-se determinar a oxidabilidade da amostra e aplicar a fórmula:

$$\text{Diluição ideal} = 5000 / (2 * \text{Oxidabilidade})$$

Pelo menos três diluições devem ser efetuadas, sendo aconselhável cinco em amostras desconhecidas. As diluições para o ensaio do CBO_5 são preparadas por sifonagem, num balão volumétrico de 1000ml de capacidade, enchendo até meio com água de diluição. Juntar o volume de amostra homogeneizada ou não, para efetuar a diluição desejada e diluir até ao nível apropriado com água de diluição. Misturar bem, por inversão repetida do balão volumétrico, tendo cuidado, de modo a evitar a retenção de bolhas de ar. Quando houver diluições envolvendo medidas de menos do que 5ml de amostra, deve ser feita primeiro a diluição da amostra num balão volumétrico e só então usar o volume correspondente desta mistura para a diluição propriamente dita. Se se pretender suprimir a nitrificação, adicionar 2ml de alitiourea por litro de amostra diluída.

Com a diluição assim preparada, enchem-se 2 frascos de Winkler (ou mais, em função do requerido). Os frascos devem ser cheios completamente, esperar alguns minutos para deixar sair as bolhas de ar aderentes às paredes dos frascos, só então são tapados, tomando precaução de evitar a retenção de bolhas de ar. Efetuar o ensaio da água de diluição utilizada no teste, ao mesmo tempo que o da amostra para permitir determinar o valor do branco. Depois de preparar as diluições, determinar a concentração inicial de O.D. no espaço de 30 minutos. Incubar o branco e as amostras durante 5 dias na estufa, a $20 \pm 1^\circ\text{C}$. Decorrido o tempo de incubação determina-se a concentração de oxigénio dissolvido na amostra e no branco, usando o método iodométrico.

As diluições que mostram um O.D. residual de 30 – 70% do O.D. inicial, uma depleção de pelo menos 2 mg/L e O.D. final de pelo menos 1mg/L devem ser consideradas as mais aceitáveis.

2.5. Cálculos

Resultado das Amostras de C.B.O. (Direto)

O resultado é dado diretamente pelo aparelho em que a carência bioquímica de oxigénio é determinada pelas expressões:

OD_i – oxigénio dissolvido da amostra antes da incubação

OD_5 – oxigénio dissolvido da amostra depois da incubação

$$CBO_5 = OD_i - OD_5$$

O resultado é expresso em miligramas de oxigénio ($mg\ O_2/L$) número referente aos dias de incubação.

Resultado das Amostras de C.B.O. (com diluições)

$$30\% \leq \frac{(OD_i - OD_5)}{OD_i} \leq 70\%$$

Em que:

OD_i – oxigénio dissolvido da amostra antes da incubação

OD_5 – oxigénio dissolvido da amostra depois da incubação

a) Método das diluições sem inóculo

$$CBO_5 = \frac{(OD_i - OD_5) 1000}{OD_i}$$

Em que :

V - volume de amostra utilizado no ensaio

b) Método das diluições com inóculo

$$CBO_5 = \frac{[(OD_i - OD_5) - (B_i - B_5)] 1000}{V}$$

Em que :

B_i – oxigénio dissolvido da água de diluição, antes da incubação

B_5 – oxigénio dissolvido da água de diluição, após a incubação

B_i e B_5 aplicado quando a depleção é superior a $0,2mg/L$.

V – volume de amostra diluída a 1000ml

O resultado é expresso em miligramas de oxigénio ($mg\ O_2/L$) número referente aos dias de incubação.

3. Carência Bioquímica de Oxigénio (CBO_5) – (método iodométrico Winkler)

3.1. Princípio

O método iodométrico baseia-se na adição de solução de hidróxido de manganês (II), seguida de uma solução de iodeto fortemente alcalina à amostra de água num frasco rolhado completamente cheio. O hidróxido de manganês (II) é oxidado pelo oxigénio dissolvido, originando um precipitado de hidróxido de manganês de valência elevada. Na presença de iões de iodo e acidificação subsequente, o hidróxido de manganês passa a um estado bivalente, com libertação do iodo equivalente ao conteúdo original de O.D. da amostra. O iodo libertado é então titulado com solução padrão de tiosulfato de sódio.

3.2. Material e Equipamento

Frascos de Winckler de 250 a 300ml

Matrizes

Pipetas volumétricas

Bureta graduada

3.3. Reagentes / Soluções

Solução de Sulfato de Manganês (II)

Dissolver 480g de sulfato de manganês(II) $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 400g de $\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ou 364g de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ em água destilada a 1000ml. A solução de sulfato de manganês(II) não deve dar cor com a solução de amido, quando adicionada a uma solução de iodeto de potássio acidificada. Filtrar a solução se não estiver límpida.

Solução de Iodeto Alcalino com Azida de Sódio

Dissolver 500g de hidróxido de sódio NaOH , ou 700g de hidróxido de potássio KOH , e 135g de iodeto de sódio NaI , ou 150g de iodeto de potássio KI , em água destilada e diluir a 1000ml. Adicionar lentamente e com agitação constante, solução de azida de sódio NaN_3 , preparada com 10g de azida de sódio dissolvida em 40ml de água destilada. Podem ser usados tanto os sais de sódio como de potássio. Este reagente após diluição e acidificação, não deve originar coloração azul na presença da solução de amido. Guardar em frasco de vidro escuro.

Ácido Sulfúrico, H_2O_4 concentrado ($d=1,84$)

Indicador de Iodo

Solução Mãe de Tiosulfato de Sódio 0,25N

Dissolver 62,05g de tiosulfato de sódio $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$, em água destilada fervida e arrefecida; Adicionar 1,5 ml de hidróxido de sódio NaOH, 6N ou 0,4g de NaOH sólido e diluir a 1000ml com água destilada. Conservar a solução em frasco de vidro escuro. Pode obter-se esta solução a partir de uma ampola de titrisol.

Solução Padrão de Tiosulfato de Sódio, 0,025N

Diluir 100ml da solução mãe de tiosulfato de sódio $Na_2S_2O_3$, de 0,25N, a 1000ml com água destilada, fervida e arrefecida. Titular esta solução com uma solução de dicromato de potássio.

Solução Mãe de Dicromato de Potássio, 0,250N

Dissolver 12,259g de dicromato de potássio $K_2Cr_2O_7$, previamente seco a $103^\circ C$, durante 2 horas, em água destilada e diluir a 1000ml.

Solução Padrão de Dicromato de Potássio, 0,0250N

Diluir 100,0ml de solução padrão de dicromato de potássio 0,250N, em água destilada e completar a 1000ml.

3.4. Procedimento

Titulação

Dissolver num Erlenmeyer aproximadamente 2g de iodeto de potássio KI, isento de iodato, em 100 a 150ml de água. Adicionar 10ml de ácido sulfúrico, 1 + 9 e 20ml de solução padrão de dicromato de potássio; Colocar ao abrigo da luz durante 5 minutos, diluir a 400ml e titular o iodo libertado com solução padrão de tiosulfato de sódio 0,025N até se obter uma coloração amarelo palha; (V´) Adicionar 2 a 4ml de solução de amido e continuar a titulação até ao momento do desaparecimento da cor azul.

Preparação da Amostra

Com a amostra colhida encher dois frascos de Winckler, adicionar ao 1º frasco 1ml de solução de sulfato de manganês (II) seguido de 1ml de reagente de iodeto alcalino com azida de sódio. Introduzir a extremidade da pipeta abaixo da superfície do

líquido. Rolhar cuidadosamente, expulsando bolhas de ar que possam existir e misturar invertendo o frasco algumas vezes. Proceder à determinação do teor em oxigénio no 1º frasco. Guardar o segundo na estufa de incubação a $20 \pm 1^\circ\text{C}$, durante 5 dias. Decorrido este tempo, proceder de igual modo à determinação do teor em oxigénio dissolvido, obtendo-se assim respetivamente o valor inicial e final de oxigénio dissolvido na água.

Determinação

Quando o precipitado sedimentar até aproximadamente metade do volume do frasco, deixando o sobrenadante límpido de flocos de hidróxido manganoso, adicionar 1ml de H_2SO_4 concentrado. Rolhar e misturar, invertendo o frasco várias vezes até à dissolução total do precipitado. Retirar para a determinação um volume correspondente a 200ml da amostra original, ou seja 202ml. Titular com solução de tiosulfato de sódio 0,025N, até se obter uma coloração amarelo palha. Juntar indicador de iodo e prosseguir a titulação até ao desaparecimento da cor azul. Ignorar qualquer coloração posterior devido ao efeito catalítico dos nitritos ou sais férricos eventualmente presentes.

3.5. Cálculos

O oxigénio dissolvido é expresso em $\text{mg O}_2/\text{L}$.

$$1 \text{ ml de Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \leftrightarrow 1 \text{ mg OD/L}$$

$$\text{Oxigénio dissolvido (mg O}_2\text{/L)} = V \times F$$

Em que :

V – volume da solução padrão de tiosulfato de sódio 0,025N, gasto na titulação.

F – fator de correção da normalidade da solução padrão de tiosulfato de sódio. ($F=20/V'$)

A carência bioquímica de oxigénio é determinada pela expressão:

$$\text{C.B.O}_5 = (\text{O}_1 - \text{O}_5) \times F$$

Em que:

O_1 – oxigénio dissolvido da amostra antes da incubação

O_5 – oxigénio dissolvido da amostra depois da incubação

4. Cloretos – Método Argentométrico

4.1. Princípio

A determinação de cloretos baseia-se no método argentométrico em meio neutro com uma solução conhecida de nitrato de prata em presença de cromato de potássio. A conclusão da reação é indicada pelo aparecimento de um precipitado com coloração cor de tijolo característica do cromato de prata.

4.2. Material e Equipamento

Pipeta volumétrica

Matraz de 250mL

Bureta

4.3. Reagentes

Solução padrão de Cloreto de Sódio (NaCl) 0,0141N

Dissolver 0,824g de NaCl, seco na estufa a 140°C, em 1000mL de água destilada.

Solução indicadora de Cromato de potássio (K₂CrO₄)

Dissolver 50g de cromato de potássio em 100mL de água. Adicionar AgNO₃ até formar um precipitado vermelho tijolo. deixar em repouso por 12h. Após as 12h, filtrar e transferir para um balão volumétrico de 1000mL. Perfazer o volume com água destilada.

Solução padrão de Nitrato de prata (AgNO₃) 0,0141N

Pesar 2,395g de nitrato de prata, e transferir para um balão volumétrico de 1000mL. Adicionar água destilada até dissolução do sal. Completar com água o volume do balão. (guardar em frasco âmbar).

4.4. Procedimento

Determinação do valor de branco

Encher um matraz com 100mL de água destilada e adicionar 1mL de solução indicadora. Titular com nitrato de prata até obter uma cor amarela baça. Normalmente obtém-se valores entre 0,2 e 0,3mL.

Para a determinação em amostras, encher um matraz com 100mL de amostra e adicionar 1mL de solução indicadora. Titular com AgNO₃.

4.5. Cálculos

Os resultados são obtidos em mgCl⁻/L:

$$\text{mgCl}^{-}/\text{L} = \frac{(A - B) \times N \times 35450}{V_{\text{Amostra}}}$$

Em que:

A - volume gasto na titulação da amostra,

B - volume gasto na titulação do branco

N - concentração de AgNO₃

5. Condutividade

5.1. Princípio

A condutividade é a medida da capacidade de uma solução aquosa de conduzir corrente elétrica. Esta capacidade depende da presença de iões, na sua concentração, mobilidade, valência e da temperatura. A maioria das soluções de compostos inorgânicos são relativamente boas condutoras.

5.2. Material e Equipamento

Instrumento de condutividade

Termómetro

Copos de plástico

5.3. Reagentes

Solução padrão de cloreto de potássio, KCl 0,0100M

Dissolver 745,6mg de KCl anidro em 1000mL de água. O valor de condutividade desta solução é de 1412µs/cm.

5.4. Procedimento

Calibrar o equipamento com solução padrão de cloreto de potássio 0,01N. Verificar o valor da constante de célula com o valor da temperatura. Se necessário, alterar este valor. Medir a condutividade das amostras.

5.5. Cálculos

Os valores são expressos em µs/cm e todos os cálculos são efetuados pelo equipamento.

6. Cor - Método de Análise Contínua com Fluxo Segmentado

6.1. Princípio

A cor é determinada por comparação espectrofotométrica da amostra com soluções coloridas de concentração conhecida. A absorção da amostra é medida a 420 nm.

6.2. Material / Equipamento

Analizador de fluxo contínuo segmentado SKALAR, modelo SAN PLUS SYSTEM

Tubos de ensaio 100 x 15 mm, em plástico

Balões volumétricos

Pipetas

6.3. Reagentes / Soluções

Solução Mãe 500mg/L Pt/Co (Hazen)

Diluir cuidadosamente 100mL de ácido clorídrico em cerca de 500ml de água destilada. Dissolver 1,246g de cloroplatinato de potássio (K_2PtCl_6) e 1,0g de cloreto de cobalto ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$), aferir a 1000ml e homogeneizar.

Preparação da Curva de Calibração

125 mg/L Pt/Co: diluir 50 ml da solução 3.1 a 200 ml

50 mg/L Pt/Co: diluir 20 ml da solução 3.1 a 200 ml

25 mg/L Pt/Co: diluir 10 ml da solução 3.1 a 200 ml

10 mg/L Pt/Co: diluir 4 ml da solução 3.1 a 200 ml

6.4. Procedimento

Ligar o autoanalizador e deixar estabilizar a temperatura durante cerca de 30min. Colocar as soluções padrão e as amostras, em tubos de plástico, na respetiva secção do aparelho. Ligar o programa SKALAR e fazer uma descrição das amostras. Ligar o programa SKALAR para começar a análise. Quando terminada a análise, fazer lavagem ao autoanalizador, durante cerca de 10min. No final da lavagem, desligar o autoanalizador.

6.5. Cálculos

Os valores são expressos em mg/L Pt/Co ou Hazen e todos os cálculos efectuados pelo software instalado.

7. Dureza

7.1. Princípio

O sal dissódico do ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) forma um complexo quando entra em contato com determinados metais, se houver uma pequena quantidade de indicador de vermelho de metileno adicionado a uma solução aquosa que contém cálcio e magnésio num pH de $10 \pm 0,1$, a solução fica rosa. Com a adição de EDTA, o cálcio e o magnésio são complexados, e a solução fica com uma coloração azul, indicando o ponto final da reação.

7.2. Material e Equipamento

Matraz de fundo redondo

Pipeta volumétrica

Bureta

7.3. Reagentes

Solução padrão de carbonato de cálcio (CaCO_3) 0,02N

Pesar 1g de CaCO_3 anidro e transferir para um balão volumétrico de 1000mL, adicionar cerca de 500mL de água e adicionar gota a gota HCL (1:1) até completar a dissolução. Adicionar mais 200mL de água e aquecer até ebulição. Deixar arrefecer e adicionar algumas gotas de vermelho de metileno, ajustando a coloração para laranja com HCl ou NH_4OH . Diluir com água destilada num balão volumétrico de 1000mL.

Hidroxido de sódio, NaOH 0,1N

Solução padrão de EDTA 0,02N

Dissolver 3,723g de EDTA em água destilada num balão volumétrico de 1000mL. Completar o volume do balão. Padronizar com 10mL de solução padrão de carbonato de cálcio, com o pH ajustado para $10 \pm 0,1$ com solução tampão.

Solução Tampão

Dissolver 16,9g de cloreto de amónio (NH_4Cl) em 143mL de hidróxido de amónio concentrado (NH_4OH). Adicionar 1,25g de sal de magnésio de EDTA e diluir num balão de 250mL com água destilada.

7.4. Procedimento

Homogeneizar o frasco contendo a amostra. Pipetar 50mL de amostra e transferir para um matraz de fundo redondo. Adicionar aproximadamente 1mL de solução tampão até pH de 10+/-0,1. Adicionar 3 a 4 gotas de vermelho de metileno até formar uma cor rosa. Encher uma bureta de 50mL com EDTA 0,02N. Iniciar a titulação, vagarosamente até a viragem da cor rosa para azul.

7.5. Cálculos

Para obter o valor de CaCO_3 das amostras usa-se a seguinte equação:

$$\text{mgCaCO}_3/\text{L} = \frac{A \times B \times 1000}{V_{\text{amostra}}}$$

Em que:

A - volume de titulante

B - concentração de EDTA

8. Fosfato - Método de Análise Contínua com Fluxo Segmentado

8.1. Princípio

A reação do molibdato de amónio é catalisada pelo tartarato de antimónio e potássio reagindo em meio ácido com soluções diluídas de fosfato para formar um complexo de fósforo-molibdato. Este complexo é reduzido pelo ácido ascórbico para formar um outro complexo de azul intenso, cuja absorvância medida a 880 nm, é proporcional à concentração.

8.2. Material / Equipamento

Analizador de fluxo contínuo segmentado SKALAR, modelo SAN PLUS SYSTEM

Tubos de ensaio 100 x 15 mm, em plástico

Balões volumétricos

Pipetas

8.3. Reagentes / Soluções

Água + FFD6

Diluir o 2mL FFD6 em 1000 ml de água e homogeneizar.

Solução de Molibdato de Amónio

Dissolver 0,23g de tartarato de antimónio de potássio em cerca de 800ml de água destilada. Adicionar cuidadosamente, com constante agitação e arrefecimento 69,4mL de ácido sulfúrico. Seguidamente, adiciona-se 6g de molibdato de amónio e dissolve-se. Perfazer a 1000 ml, juntar 2mL FFD6 e homogeneizar.

Solução de Ácido Ascórbico

Dissolver 11g de ácido ascórbico em cerca de 800ml de água destilada. Adicionar com agitação 60mL de acetona. Perfazer a 1000 ml, juntar 2mL de FFD6 e homogeneizar.

Solução Mãe 100ppm em P_2O_5

Dissolver 0,1918g de dihidrogeno-fosfato de Potássio anidro em cerca de 800ml de água destilada. Perfazer o volume a 1000ml e homogeneizar.

Solução Padrão de 10ppm em P_2O_5

Diluir 10 ml da solução mãe a 1000ml com água destilada.

Preparação da Curva de Calibração

Gama de 5-250 ppb em fosfato :

0,1 mg/L P_2O_5 : diluir 1 ml da solução 4.2 a 100ml com água destilada

0,06 mg/L P_2O_5 : diluir 0,6 ml da solução 4.2 a 100ml com água destilada

0,04 mg/L P_2O_5 : diluir 0,4 ml da solução 4.2 a 100ml com água destilada

0,02 mg/L P_2O_5 : diluir 0,2 ml da solução 4.2 a 100ml com água destilada

Gama de 50-2500 ppb em fosfato

0,25 mg/L P_2O_5 : diluir 2,5 ml da solução 4.2 a 100ml com água destilada

0,2 mg/L P_2O_5 : diluir 2,0 ml da solução 4.2 a 100ml com água destilada

0,15 mg/L P_2O_5 : diluir 1,5 ml da solução 4.2 a 100ml com água destilada

0,1 mg/L P_2O_5 : diluir 1,0 ml da solução 4.2 a 100ml com água destilada

8.4. Procedimento

Ligar o autoanalisador e deixar estabilizar a temperatura durante cerca de 30min. Anexar os reagentes nos sítios correspondentes, verificando que nenhum tubo se encontrava entupido e colocar, tanto as soluções padrão como as amostras, em tubos de plástico. Ligar o programa SKALAR no computador anexado ao autoanalisador e fazer uma descrição das amostras. Quando o fluxo dos reagentes estiver constante,

ligar o programa SKALAR para começar a análise. Quando terminada a análise, remover todos os reagentes e fazer lavagem ao autoanalisador, durante cerca de 30min. No final da lavagem, desligar-se o autoanalisador.

8.5. Cálculos

Os valores são expressos em mg/L P_2O_5 e todos os cálculos efectuados pelo software instalado.

9. Oxidabilidade ao Permanganato de Potássio

9.1. Princípio

Consiste em determinar a quantidade de permanganato de potássio que em meio ácido, durante 10 minutos e à ebulição, cede o oxigénio necessário para fazer a oxidação da matéria orgânica existente na amostra. O excesso de permanganato de potássio determina-se fazendo-o reagir com ácido oxálico.

9.2. Material e Equipamento

Placa de aquecimento
Goblé de 250 ml
Balões volumétricos
Pipetas volumétricas
Bureta

9.3. Reagentes

Todas as soluções devem ser preparadas com água destilada ou de qualidade adequada.

Solução de Ácido Oxálico, 0,01N, em Meio Sulfúrico

Dissolver 0,6303 g de ácido oxálico cristalizado numa solução de 50 ml de ácido sulfúrico conc. ($d = 1,84$) em 900ml de água destilada. Arrefecer e perfazer o volume a 1000ml com água destilada. Usar ampolas titrisol, sempre que disponíveis.

Solução de Ácido Sulfúrico, 1+3 (V/V)

Adicionar com precaução um volume de ácido sulfúrico conc. ($d = 1,84$) a três volumes de água destilada.

Solução de Permanganato de Potássio, 0,01N

Dissolver 0,35g de permanganato de potássio em água destilada e perfazer o volume a 1000ml. Usar ampolas titrisol, sempre que disponíveis.

Solução Padrão de Resorcinol

Dissolver 0,10g de Resorcinol, $C_6H_6O_2$, em 1000ml de água destilada. Da solução padrão preparada retirar 1ml e diluir para 100ml, esta solução final é a que será utilizada como padrão 1,9mg/l.

9.4. Procedimento

Preparação dos Goblés para a análise e Aferição do Título de $KMnO_4$

Ferver num goblé durante 10 minutos, uma mistura de 100ml de água destilada, 10ml de ácido sulfúrico 1+3 e 5ml de solução de permanganato de potássio. Retirar da placa de aquecimento e adicionar, gota a gota, solução de ácido oxálico, 0,01N, até descoloração. Juntar depois, gota a gota, a solução de permanganato até leve coloração rósea. Medir 10ml da solução 0,01N de ácido oxálico para o goblé acabado de preparar. O conteúdo do goblé deve ficar incolor e titula-se com a solução de permanganato de potássio aproximadamente 0,01N, até leve coloração rósea persistente. Verificar a quantidade de solução gasta (V). O goblé só será esvaziado no momento de se utilizar.

Análise de $KMnO_4$ nas amostras

Homogeneizar a água a analisar e medir 100ml desta ou uma alíquota para o Goblé, preparado no ponto anterior. Adicionar 10ml de ácido sulfúrico, 1+3, e aquecer. Logo que entre em ebulição, adicionar o número de ml da solução de permanganato equivalente (V). Ferver durante 10 minutos. Se por acaso a cor desaparecer juntar outro V (ml) de solução de $KMnO_4$ e assim sucessivamente até que a cor permaneça e anota-se o n.º de vezes que se deitou o permanganato de potássio (n). Decorrido o tempo indicado, adicionar 10 ml da solução de ácido oxálico 0,01N, agitar e adicionar solução de permanganato de potássio até leve coloração rósea (V1).

9.5. Cálculos

A Oxidabilidade ao permanganato de potássio é expressa em $mg\ O_2/L$, e dada pela expressão:

$$\frac{(n-1) V + V_1}{V} \times 8$$

Em que :

V_1 – volume da solução de permanganato de potássio gasto na amostra em ensaio

V – volume da solução de permanganato de potássio gasto na titulação de 10ml de solução ácido oxálico, 0,01N

n – n.º total de volumes V , de solução de permanganato de potássio, adicionados.

Nota: Ao padrão descontar sempre o branco

10. Sólidos Suspensos Totais

10.1. Princípio

A determinação das várias formas de sólidos é dada pela diferença entre a massa seca e a massa húmida, em relação ao volume de amostra.

10.2. Material e Equipamento

Balança analítica

Estufa

Pinça

Vidros de relógio

Membrana de filtração de 1,2µm

Matraz

Funil

10.3. Reagentes

Padrão de celulose microcristalina

Dissolver 0,500g de celulose em 100mL de água.

10.4. Procedimento

Colocar uma membrana no funil. Passar até 1000mL de amostra pelo sistema de filtração e ligar o vácuo. Após a filtração da amostra, fazer lavagem do funil com água destilada. Retirar a membrana e coloca-la num vidro de relógio previamente pesado e

colocar a amostra na estufa cerca de 2h. Retirar a amostra e colocar no excicador até a amostra atingir a temperatura ambiente. Retirar e anotar o peso.

10.5. Cálculos

O valor de sólidos suspensos totais em mg/L é dado por:

$$\text{mg/L} = \frac{P_1 - P_2}{V_{\text{amostra}}} \times 1000$$

Em que:

P_1 – peso da amostra + vidro de relógio

P_2 – vidro de relógio